

SÉRIE A,
n° 3129

N° D'ORDRE
4001

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Lise MARCAUD-RAEBER

1^{re} THÈSE : **Contribution à l'étude d'une nouvelle protéine myofibrillaire chez l'animal adulte et chez le fœtus (lapin, mouton), la métamyosine.**

2^e THÈSE : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 21 mai 1958 devant la Commission d'Examen :

MM. WURMSER, *Président.*

TONNELAT }
LEDERER } *Examineurs.*

IMPRIMERIE E. LANORD
22 bis, RUE CHAUVELOT, PARIS-XV^e

1958

SÉRIE A,
n° 3129

N° D'ORDRE
4001

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Lise MARCAUD-RAEBER

1^{re} THÈSE : **Contribution à l'étude d'une nouvelle protéine myofibrillaire chez l'animal adulte et chez le fœtus (lapin, mouton), la métamyosine.**

2^e THÈSE : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le , devant la Commission d'Examen :

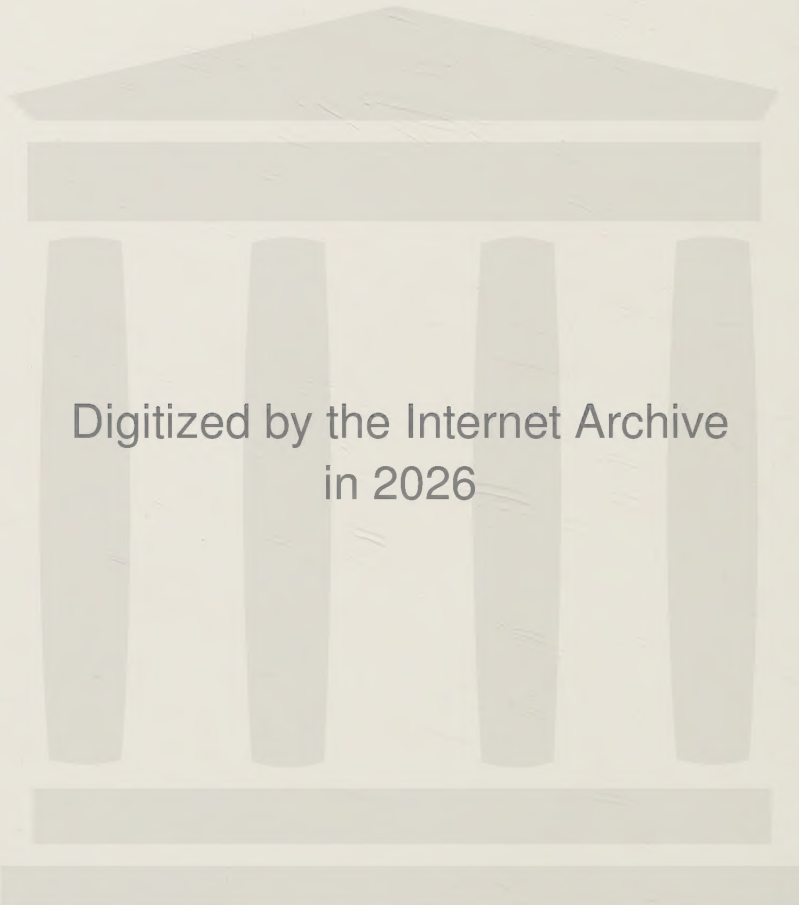
MM. WURMSER, *Président.*

TONNELAT }
LEDERER } *Examineurs.*



IMPRIMERIE E. LANORD
22 bis, RUE CHAUVELOT, PARIS-XV^e

1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PÉRÈS

G. JULIA	T Analyse sup. et Alg. supérieure.	PETIT	T Biol. maritime.
FOCH	T Méc. physique et expérimentale.	QUENEY	T Météorologie et dyn. atmosphérique.
PAUTHENIER	T Electrotechnique génér.	GALLIEN	T Embryologie.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	EICHHORN	T Biol. Vég. (P.C.B.).
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	DE GUGNAC	T Biol. Vég. (P.C.B.).
GARNIER	T Géométrie supérieure.	M ^{me} CAUCHOIS ..	T Chimie Physique.
PERES	T Mécan. des fluides et applications.	THELLIER	T Physique du Globe.
LAUGIER	T Physiologie générale.	L'HÉRITIER	T Génétique.
M. CURIE	T Physique (P. C. B.).	GRIVET	T Radio-électricité.
BARRABÉ	T Géol. struct. et Géol. appliquée.	PONCIN	T Méc. des fluides.
G. DARMOIS ..	T Calcul des probabil. et Physique Math.	DUBREIL	T Arith. et théorie des nombres.
J. BOURCART ..	T Géogr. phys. et Géol. dynamique.	QUELET	T Chimie organique.
PLANTEFOL	T Botanique.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
GRASSÉ	T Evol. des êtres organ.	CHAMPETIER ..	T Chimie macromolécul.
PREVOST	T Chimie organique.	CUVILLIER	T Géol. struct. et Géol. appliquée.
BOULIGAND	T Appl. de l'analyse à la Géométrie.	JUNG	T Pétrographie.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	TRILLAT	T Microscopie et diff. électronique.
WYART	T Minéralogie.	WIEMANN	T Chimie organique et structurale.
TEISSIER	T Zoologie.	JACQUINOT	T Spectroscopie et Phys. céleste.
MANGENOT	T Biologie végétale.	VASSY	T Phys. de l'atmosphère.
P. AUGER	T Physique quantique et Relativité.	DESTOUCHES ..	T Théories physiques.
MONNIER	T Physiol. des fonctions.	M. PRUVOST ..	T Géologie.
PIVETEAU	T Géologie.	AMIEL	T Chimie (P.C.B.).
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	HOCART	T Minéralogie.
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	J.-P. MATHIEU..	T Physique (P.C.B.).
LAFFITTE	T Chimie Générale.	COUTEAUX	T Biol. animale (P.C.B.).
FAVARD	T Mécanique Générale.	MAY	T Biol. animale (P.C.B.).
COULOMB	T Physique du Globe.	CHOQUET	T Calc. différentiel et Intégral.
M ^{me} COUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).	FELDMANN	T. Biologie (P.C.B.).
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	GUINIER	T Physique (P.C.B.).
P. DRACH	T Zoologie.	JOST	T Biologie (P.C.B.).
KASTLER	T Physique.	FORTET	T Calc. des probabilités.
EPHRUSSI	T Génétique.	SCHWARTZ	T Méth. Math. de la physique.
WURMSER	T Biol. physico-chimique.	CHOUARD	T Physiologie Végétale.
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.).	MALAVARD	T Aviation.
GAUTHERET	T Biol. Végétale (P.C.B.).	BRELOT	T Calcul différentiel.
LUCAS	T Recherches physiques.	NORMANT	T Chimie (P.C.B.).
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	BENARD	T Chimie (P.C.B.).
ARNULF	T Optique appliquée.	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
M. MORAND	T Enseignement de Phys.	DUGUE	T Statistiques mathém.
SOLEILLET	T Physique.	GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.).
FORTIER	T Mécanique expér. des fluides.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
DANJON	T Astronomie.	ULRICH	T Physiol. Végétale.
LAPORTE	T. Phys. générale et Radioactivité.	MARÉCHAL	T Optique théorique et appliquée.
JANET	T Mécan. anal. et Mécanique céleste.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
		CHADEFAUD	T Botanique.
		DESTRIAU	T Physique (M.P.C.).
		M ^{me} LE BRETON ..	T Physiologie générale.

SALEM	T Mathém. générales.	SOUCHAY	Chimie (P.C.B.).
LELONG	T Mathém. générales.	AIGRAIN	Physique (P.C.B.).
DEVILLERS	Anatomie et Histologie comparées.	BRUSSET	Chimie (P.C.B.).
EHRESMANN	T Topologie Algébrique.	M. LÉVY	Physique théorique.
FRANÇON	Physique (M.P.C.).	LENORMANT	Physiologie.
GLANGEAUD	T Géogr. physique et Géol. dynamique.	M ^{me} CHAIX	Chimie biologique.
GODEMENT	T Mathématiq. (M.P.C.)	M ^{me} HUREL-PY .	Biol. Végétale (P.C.B.)
PISOT	T Calcul des Probabilités.	PIAUX	Chimie (P.C.B.).
ROCH (E.)	T Géologie.	BRUN	Méc. exper. des fluides.
SCHATZMANN ..	Astrophysique.	LEDERER	T Chimie biologique.
TERMIER	T Paléontologie stratigr.	M ^{me} DUBREIL ..	T Mathématiques.
ZAMANSKY	T Mathém. générales.	M ^{me} LELONG	T Mathématiques (E.N.S.)
JOLIOT	T Physique nucléaire et Radioactivité.	BELLAIR	Géologie (S.P.C.N.).
LENNUIER	Physique (P.C.B.).	COTTE	T Physique (M.P.C.).
RIZET	Génétique.	DUBOIS (J.-E.).	T Chimie.
M ^{me} TONNELAT ..	Théories physiques.	LAMOTTE	Zoologie.
DIXMIER	Mathématiq. (M.P.C.)	MICHEL	T Chimie (P.C.B.).
		OLMER	T Energétique générale.
		ROUAULT	T Physique (S.P.C.N.).
		GAUTHIER	T Mécanique appliquée.

Secrétaire Général C. MONIER

A MES PARENTS,
A MON MARI.
A MA SŒUR,
A MES AMIS.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ROBERT DEBRÉ,

qui a bien voulu nous recevoir dans le Laboratoire de Recherches de Biochimie Médicale de l'Hôpital des Enfants Malades, en témoignage de respectueuse gratitude ;

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ WURMSER,

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, en remerciement respectueux pour les conseils qu'il a bien voulu nous donner ;

A MONSIEUR LE PROFESSEUR TONNELAT :

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LEDERER,

qui ont accepté de faire partie de notre jury, avec toute notre reconnaissance ;

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ GEORGES SCHAPIRA,

qui nous a accueillie dans son laboratoire et nous a guidée pas à pas dans nos recherches, en témoignage de notre respectueux et profond attachement ;

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J.-C. DREYFUS,

en remerciement respectueux pour les conseils précieux qu'il nous a constamment prodigués ;

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ JACQUES KRUH,

qui nous a initiée à la technique d'électrophorèse et n'a cessé, par la suite, de nous encourager ;

A MONSIEUR M. JOLY,

dont les conseils nous ont été si précieux ;

A MADAME LE DOCTEUR F. SCHAPIRA ;

A MES AMIS DU LABORATOIRE : D. LABIE, J. CADILLON, J. DEMOS, P. PADIEU,
J. ROSA, R. SADDI, V. SCHWARZMANN ;

A M^{mes} AFFICHARD, LAVALLÉE ;

A M^{lles} ALEXANDRE, DE LANNURIEN, VIBERT, VIGOURA ;
ET TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE,

à qui ce travail doit tant.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I. — REVUE DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA COMPOSITION PROTEINIQUE DE LA MYOFIBRILLE DU MUSCLE STRIE DES MAMMIFERES ADULTES.

Les travaux sur la composition des myofibrilles s'orientent d'une part vers le dénombrement des protéines existant dans les myofibrilles et, d'autre part, vers leur localisation dans les différentes zones histologiques.

La myofibrille est constituée par une succession de bandes A, aniso-

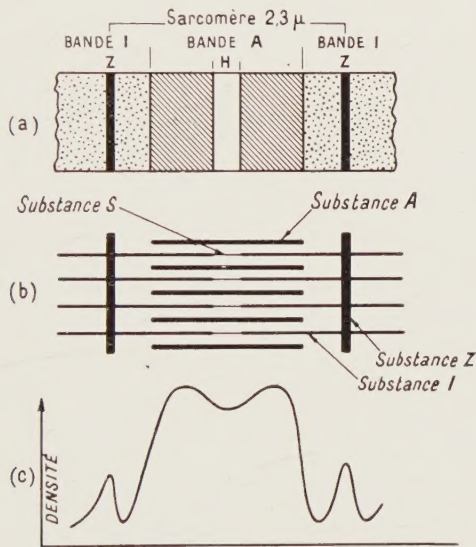


FIG. 1. — Myofibrille au repos, d'après Huxley et Hanson (27)
(a) Schéma des striations de la myofibrille; (b) Schéma de la structure submicroscopique; (c) Courbe obtenue au densimètre

tropes, et de bandes I, isotropes. Les bandes A sont coupées par une zone H, moins dense, tandis que les bandes I sont traversées en leur milieu par une bande Z plus dense que I.

Le microscope électronique a permis de déceler deux sortes de filaments: les premiers, fins, traversent sans interruption les bandes I et les bandes A. Cependant, à l'intérieur de la zone H, une substance S remplace

la substance I qui compose ces filaments. Les seconds, plus épais, ne s'étendent que sur la bande A.

Passons maintenant en revue les protéines d'origine myofibrillaire connues et situons-les, lorsque c'est possible, par rapport aux bandes que nous avons décrites.

Ces protéines ne sont extractibles que par des solutions salines de force ionique élevée ou après action de solvants organiques. Elles forment le groupe II des diagrammes électrophorétiques des extraits musculaires totaux selon Dubuisson (12).

Deux protéines ont été très étudiées et jouent vraisemblablement un rôle prépondérant dans la contraction musculaire. Ce sont la myosine et l'actine, ainsi que le complexe qu'elles forment, l'actomyosine.

La myosine s'obtient par une extraction courte (pas plus de dix minutes), alors que le muscle contient encore de l'ATP, au moyen de solutions salines concentrées, de force ionique égale à 0,6. Elle est caractérisée par ses propriétés de solubilité : précipitation en milieu salin peu concentré ($\mu < 0,1$) et solubilisation à force ionique élevée. Elle est soluble à la force ionique de 0,3. La myosine donne des solutions visqueuses ($[\eta]_i = 230$), présentant le phénomène de la biréfringence d'écoulement. Son point isoélectrique est au pH 5,4, d'après la détermination de Erdos et Snellmann (17). Sa mobilité est $-2,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec}$ au pH 7,1.

En 1939, Engelhardt et Ljubimova (16) découvrent l'activité ATPasique de la myosine: cette réaction, entre une protéine que l'on soupçonne avoir un rôle important dans la contraction musculaire et l'ATP que l'on peut considérer comme un lieu de stockage de l'énergie produite par la glycogénolyse et la respiration, a suscité de nombreux travaux. On a voulu y voir le lien permettant l'utilisation de l'énergie chimique contenue dans la liaison pyrophosphate de l'ATP pour produire le mouvement. Cette thèse, défendue par Weber et Portzehl (74) est contredite par d'autres (Bowen, 6, Morales et Botts, 39), qui constatent qu'il n'y a pas de corrélation entre l'action de la myosine sur l'ATP et le raccourcissement des fibres.

Plus tard, on a trouvé, dans les préparations de myosine, une deuxième activité enzymatique : acide adénylique désaminasique (Ferdman, Netchiporenko (18). Engelhardt (15) réussit à séparer par l'action de la chaleur l'activité désaminasique de l'activité ATPasique et posa le problème de savoir s'il y avait identité de la myosine et de la désaminase, ou seulement association physiologique des deux enzymes.

Locker (34), qui a repris récemment ces expériences, pense que l'on sépare par l'action de la chaleur un constituant important de la myosine elle-même, doué d'activité désaminasique, peut-être même identique à la L-méromyosine de Andrew Szent-Gyorgyi (65).

Cependant, récemment (Mars 1957), Arthur Samuels (53), au cours d'un travail d'immunochimie sur la myosine, suppose que la désaminase n'est qu'un agent contaminant des préparations de myosine et ne fait pas partie intégrante de la molécule de myosine.

De plus, la récente cristallisation d'une désaminase d'origine myofibrillaire par Ya-Pin-Lee (76), différente de la myosine mais ayant des propriétés d'extractibilité identiques, renforce cette façon de voir.

Enfin, la myosine possède également une activité acétylcholinestérique (32).

Des études sur les quantités de myosine extraites des myofibrilles et les quantités de substance A contenue dans les grosses fibres des bandes A, ont permis à Hanson et Huxley (25) de conclure non seulement à l'identité des deux, mais encore de prouver qu'au moins les 4/5^e de la myosine sont présents dans les myofibrilles comme substance A, et de faire raisonnablement l'hypothèse que toute la myosine est concentrée dans les bandes A.

L'*actomyosine* est un complexe de molécules de myosine et de molécules d'actine dans des proportions encore discutées. Elle est extraite du muscle, en absence d'ATP, donc par des extractions longues (plusieurs heures), au moyen de solutions salines concentrées. Elle précipite dans des solutions de force ionique inférieure à 0,3. Sa mobilité au pH 7,1 est de $-2,95 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec. Elle donne des solutions extrêmement visqueuses dont la viscosité, dans certaines conditions de salinité, diminue sous l'action de l'ATP. La viscosité finale est voisine de la somme des viscosités de la myosine et de l'actine. On interprète ce résultat en supposant que l'ATP détruit le complexe et libère les deux constituants. Ce phénomène a été décrit par Needham (42) en 1941. Si les conditions de température sont favorables, la myosine libérée détruit l'ATP grâce à son activité ATPasique et le complexe se reforme en même temps que la viscosité augmente à nouveau. L'ATP agit également sur les gels d'actomyosine en provoquant, dans certaines conditions de salinité, le phénomène de la superprécipitation (Szent-Gyorgyi, 63).

Enfin, on peut faire des fils d'actomyosine capables de se contracter sous l'influence de l'ATP, modèles plus ou moins fidèles de la myofibrille musculaire elle-même, qui ont été très étudiés.

L'*actine* a été isolée par Straub (57) en 1942. Elle s'extraît par l'eau de la pulpe musculaire traitée auparavant par des solvants organiques (acétone). L'actine existe sous deux formes : l'une, globulaire, de faible viscosité, qui, en milieu salin KCl 0,1 M et en présence d'ATP, se polymérise en donnant l'autre forme fibrillaire, plus visqueuse. Cette réaction est réversible.

Seule la forme fibrillaire est capable de s'unir à la myosine en milieu salin concentré (KCl 0,6 M) pour donner de l'actomyosine.

La quantité d'actomyosine formée, que l'on estime par la chute de viscosité sous l'action de l'ATP, pour une certaine quantité d'actine mise en réaction, caractérise « l'activité » de la préparation d'actine.

L'actine, d'après Hanson et Huxley (25), fait partie de la substance I qui forme les petites fibres continues de la myofibrille musculaire.

En dehors de ces protéines, d'autres ont été décrites, sur lesquelles nous sommes beaucoup moins bien renseigné. Nous allons les passer en revue :

La *tropomyosine* a été décrite pour la première fois par Bailey en 1948 (2) qui l'extraît du muscle par KCl M après action de solvants organiques. Mais elle s'extraît également en petite quantité à force ionique faible.

Elle précipite au pH 4,6 et à la force ionique de 0,05 μ . Elle précipite également dans le sulfate d'ammonium de 50 à 66 p. cent de saturation. Ces deux dernières propriétés servent à sa purification. Son point isoélectrique est voisin de 5. Au pH 7,1 et $\mu = 0,35$, la mobilité de la tropomyosine est de $-4,3 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/Sec (23). La tropomyosine est soluble au-dessus de son point isoélectrique. La viscosité des solutions de tropomyosine diminue quand la force ionique augmente : ceci reflète une variation du poids moléculaire. Le monomère aurait un poids moléculaire voisin de 53.000 ou 60.000 (Tsao, Bailey et Adair, 69).

Bailey (2), trouvant beaucoup d'analogies entre la tropomyosine et la myosine, émit l'hypothèse qu'elle était un précurseur de la myosine. Mais Tsao (68) ne put la préparer à partir de la myosine et Robinson (52) ne trouva pas d'augmentation quantitative de cette protéine chez l'embryon de poulet par rapport à l'adulte.

À côté de la tropomyosine, on trouve une *nucléotropomyosine*. D'abord décrite par Hamoir (22) chez le poisson, en même temps que la tropomyosine, Shens-Pei-Ken et Tsao-Tien-Chin (54) la retrouvent entre autres dans les muscles striés des mammifères. Elle peut s'extraire après action des solvants ou par simple extraction saline. Elle précipite à pH 5, à la force ionique de 0,05, contrairement à la tropomyosine; mais elle a la même mobilité à l'électrophorèse. L'acide nucléique est uniquement de l'acide ribonucléique. Le spectre en U.V. des préparations de nucléotropomyosine présente un maximum à 260 m μ ou 278 m μ et tous les intermédiaires.

Shens-Pei-Ken et Tsao-Tien-Chin pensent que la tropomyosine pourrait être responsable de la capacité du muscle à soutenir la contraction, mais ils lui refusent un rôle dans la contractibilité musculaire. Cette opinion s'oppose à celle de Snellmann (56) qui attribue le rôle joué par la myosine dans les muscles striés à la tropomyosine dans les muscles lisses, où elle se combinerait à l'actine en présence d'acides nucléiques et d'une protéine liée à des phosphates. D'après Corsi et Perry (8), la tropomyosine se trouverait dans les bandes I et A de la myofibrille, comme l'actine à laquelle elle serait associée.

Dubuisson (13) a décrit dans les extraits musculaires une *myosine* γ ou *contractine*. Elle est plus abondante dans les extraits de muscles contracturés d'où son nom. Il la caractérise par sa mobilité dans les extraits. Nous avons isolé cette protéine avec Schapira et Dreyfus et nous en avons déterminé quelques propriétés (53 bis). Cette protéine, précipitée, a un aspect caoutchouteux très caractéristique: le précipité s'enroule autour de l'agitateur et peut s'étirer. Mais cette propriété ne permet de faire encore aucune hypothèse sur le rôle éventuel de cette protéine dans la myofibrille.

Dubuisson a décrit également la *protéine* Y (14) en 1950. Elle est extraite seulement par des solutions de force ionique supérieure à 0,5. Elle ne peut être extraite que du muscle normal au repos, non contracturé. Cette protéine a été isolée de l'extrait musculaire en la précipitant avec l'actomyosine par le sulfate d'ammonium à 35 p. cent au pH 6,0, puis en la séparant de l'actomyosine par précipitation de cette dernière à 0,05 μ . En effet, la protéine Y est soluble jusqu'à 0,005 μ . Les solutions

sont peu visqueuses et ne présentent pas le phénomène de la biréfringence d'écoulement. Dans les extraits musculaires, à l'électrophorèse, la protéine Y migre entre la myosine et la contractine.

Amberson et ses collaborateurs (1 et 4) observent à l'électrophorèse dans les extraits musculaires faits à force ionique très élevée, la présence d'une *D-protéine*, de mobilité plus grande que la myosine, mais soluble à faible force ionique comme le myogène. En réalité, la *D-protéine* est un mélange complexe dont la fraction la plus intéressante, la Δ -protéine, peut s'unir à la myosine pour former un complexe, la Δ -myosine. La Δ -protéine est plus visqueuse que la myosine, elle peut déplacer l'actine de l'actomyosine pour former la Δ -myosine. Elle se rapproche le plus de la tropomyosine dont elle pourrait être une forme polymérisée. Elle pourrait être la substance S de la myofibrille, bien qu'on ne lui connaisse pas de propriétés élastiques.

A. Szent-Gyorgyi, D. Mazia et Andrew Szent-Gyorgyi (1955) (66) en faisant des bilans des quantités de myosine, d'actine et d'azote total, contenues dans des extraits glycerinés de muscle après élimination des protéines globulaires, constatent qu'une *protéine X*, inconnue, est extraite en même temps que la myosine. D'après ces auteurs, elle proviendrait des bandes A comme la myosine, dont elle diffère par sa solubilité à faible force ionique.

Villafranca, en 1956, (73) reprit ce travail sur cette protéine qu'il nomme « extra-protéine » ou E.P. Il en précise certaines propriétés et conclut que E.P. est différente de la myosine, de l'actine et de la tropomyosine. Il pense qu'elle pourrait être en relation avec la *D-protéine* d'Amberson.

Par contre, un travail de Perry (47 et 49) suggère qu'une partie de ces protéines, extraites en même temps que la myosine, pourrait être une forme inactive d'actine. Il a trouvé que 13 p. cent des protéines totales des fibrilles lavées, isolées de muscles frais, étaient lentement extraits par un tampon borate 0,078 M. Un tiers de cet extrait est constitué de tropomyosine, mais le reste, appelé « *pseudo-globuline* », est identique apparemment à une protéine obtenue par dialyse d'actine fibrillaire contre le tampon borate 0,078 M. Perry pense qu'il s'agit d'une forme inactive d'actine et qu'elle pourrait être présente dans la fraction X de Szent-Gyorgyi.

Huxley et Hanson (25 et 27), qui ont repris les travaux de Szent-Gyorgyi s'accordent sur ce point de vue avec Perry. Ils pensent que l'hypothèse la plus raisonnable est que cette protéine X provient de la substance I et non pas de la substance A, comme la myosine.

Citons seulement, également, les *peptomyosines* de Bourdillon (6), isolées du muscle de bœuf et de cheval grâce à leur très grande résistance à la dégradation pepsique, mais dont la réalité physiologique n'est pas encore établie.

Enfin, la *désaminase* cristallisée tout récemment par Ya-Pin-Lee (76), que nous avons déjà citée, est la dernière protéine myofibrillaire isolée aujourd'hui. Elle est extraite par la même solution d'extraction que les myosines, et précipite également à faible force ionique. Elle reste en solution après chauffage à 50° pendant 2 minutes. Elle a été obtenue cristallisée, et pure enzymatiquement. Son poids moléculaire est de

320.000. Sa mobilité à l'électrophorèse est différente de celle de la myosine; nous reviendrons sur ce point ainsi que sur les caractéristiques de son activité enzymatique.

Nous nous tournerons maintenant vers deux protéines, la *L*- et la *H*-méromyosine, qui n'ont pas été extraites du muscle, mais obtenues *in vitro* à partir de la myosine par digestion ménagée trypsique. En effet, A. Szent-Gyorgyi (65), à la suite de l'étude de Milahyi (35-36-37) sur la digestion trypsique de la myosine, isole deux produits de cette digestion ménagée et en étudie les propriétés.

La *H*-méromyosine a une faible viscosité ($[\eta]_1 \simeq 30$ g/ml), est soluble à faible force ionique, a un poids moléculaire de 232.000, et possède deux propriétés caractéristiques de la myosine : activité ATPasique et pouvoir de se combiner à l'actine.

La *L*-méromyosine possède les propriétés de solubilité de la myosine; elle est plus visqueuse que la *H*-méromyosine ($[\eta]_1 = 100$) et son poids moléculaire est de 96.000. Elle ne peut se combiner à l'actine et n'a pas d'activité ATPasique. Nechorocheff, Dondon et Goussef (43) lui trouvent une certaine activité acide adénylique désaminasique. Varga et ses collaborateurs lui attribuent l'activité cholinestérasique de la myosine (70). Nanninga (40-41) a déterminé le point isoélectrique de la *L*-méromyosine à 5,8-5,7, celui de la *H*-méromyosine à 5,2. La myosine serait formée de 43 p. cent de *L*-méromyosine et de 57 p. cent de *H*-méromyosine.

Par l'action de la chymotrypsine, on obtient également deux produits de digestion dont les propriétés sont comparables à celles de la *L*- et de la *H*-méromyosine, d'après les travaux de Gergely (21).

Snellmann (55) sépare des solutions de myosine par relargage par le sulfate d'ammonium à 20° et 34°, une fraction *L* précipitant à 33 p. cent de saturation qu'il identifie à la *L*-méromyosine, et une fraction *H* précipitant à 40 p. cent de saturation, capable de se combiner à l'actine.

La dégradation de la molécule de myosine peut encore être poursuivie, en faisant agir l'urée sur la *L*-méromyosine. La *H*-méromyosine n'est pas attaquant dans ces conditions. La dégradation de la *L*-méromyosine aboutit à la formation de molécules, appelées protomyosines, monodispersées pour la forme et la taille (poids moléculaire environ 4.600), mais hétérogènes à l'électrophorèse (4 constituants), solubles dans les solutions de faible force ionique. Cette action de l'urée et l'obtention des protomyosines est spécifique de la *L*-méromyosine. Les auteurs, A. Szent-Gyorgyi et Borbiri (67), pensent obtenir ainsi l'unité constitutive de la molécule de myosine, dont Joly, Schapira et Dreyfus postulent également l'existence pour interpréter les résultats qu'ils obtiennent dans l'étude de la longueur des particules de myosine dans les solutions diluées (27 bis).

En définitive,

A) Nous connaissons bien quelques protéines myofibrillaires : myosine, actine, actomyosine, tropomyosine et avec moins de détails, la contractine, la protéine Y, la désaminase.

Les autres sont

ou des substances encore mal définies (D-protéine, E.P.),

ou des artéfacts de préparation, intéressants mais qui ne sont peut-être pas des produits biologiques (Méromyosines, Protomyosines);

B) D'autre part on connaît probablement la localisation de l'actine et de la myosine et par suite, de l'essentiel des bandes A et I. Mais on ignore la localisation des autres protéines, la composition des zones H et Z et la nature de l'éventuel substratum de l'élasticité (Substance S).

II. — REVUE DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA COMPOSITION PROTÉINIQUE DE LA MYOFIBRILLE DU MUSCLE STRIÉ DES FOETUS DE MAMMIFÈRES.

La dernière phase du développement musculaire fœtal est caractérisée, d'après Joubert (28), chez le fœtus de mouton, par une augmentation brutale du diamètre des myofibrilles du 100^e jour de la gestation jusqu'à la naissance qui survient vers le 140^e jour. Pendant cette dernière période, les protéines spécifiques s'accumulent rapidement : les protéines myofibrillaires, en particulier, augmentent par rapport au poids frais du muscle et par rapport aux protéines musculaires totales, d'après Hermann et Nicholas (26).

À côté de ces différences quantitatives, certains travaux révèlent des modifications qualitatives posant le problème de différence de spécificité opposant une protéine fœtale à son homologue adulte.

Crepax (9) a montré que dans les extraits musculaires fœtaux l'actomyosine migre à l'électrophorèse avec une mobilité plus grande que chez l'adulte, tandis que la myosine est ralentie. Ce phénomène, s'il n'est pas dû à l'influence d'autres molécules présentes dans l'extrait, comme les acides nucléiques par exemple, révélerait une différence de structure entre les protéines fœtales et adultes.

Kasavina (30-31) a montré par ses travaux sur l'actomyosine fœtale, que cette protéine ne devient fonctionnelle, c'est-à-dire capable de donner des fils se contractant sous l'influence de l'ATP et des solutions dont la viscosité diminue sous l'action de l'ATP., qu'à partir d'un certain stade de développement du fœtus, bien postérieur à l'apparition de la protéine elle-même. L'acquisition par l'actomyosine de ses propriétés fondamentales apparaît à des dates différentes suivant l'espèce animale considérée, correspondant aux degrés d'évolution différents de ces espèces à la naissance.

De même Villafranca (72) fait remarquer que, chez le fœtus de rat, avant l'apparition de la myosine douée d'activité ATPasique, pourrait exister dans le muscle une myosine inactive, ayant des propriétés de solubilité différentes. Cette vue s'accorde avec celle de Varga et ses collaborateurs (71) pour lesquels la myosine fœtale possède, par contre, une plus grande activité cholinestérasique.

Enfin l'actine, chez le fœtus, possède un spectre en U.V. différent de celui de l'actine adulte, parce qu'elle entre dans un complexe avec des acides nucléiques (51).

Nous avons retrouvé, au cours de ce travail, certains aspects de l'évolution de la composition protéinique du muscle fœtal : variations quantitatives des proportions relatives entre certaines protéines au cours de la vie fœtale et d'autre part variations qualitatives des propriétés d'une protéine fœtale par rapport à la forme adulte.

III. - - OBJET DU TRAVAIL.

Nous avons, dans ce travail, mis en évidence un groupe de protéines, d'origine myofibrillaire, dans le muscle strié du lapin et du mouton, chez l'animal adulte et chez le fœtus (50 bis).

Ces protéines, dont les propriétés d'extractibilité et de solubilité sont voisines de celles de la myosine, s'en distinguent principalement par une mobilité électrophorétique plus faible au pH 7,1. C'est en raison de leurs positions sur les images électrophorétiques obtenues à ce pH, que nous leur avons donné le nom de « *métamyosines* ». Dans les électrophorèses d'extraits musculaires totaux, elles sont masquées par les protéines du groupe du myogène. Ceci explique qu'elles aient pu passer inaperçues dans les extraits de muscles fœtaux, où nous verrons qu'elles sont parfois aussi abondantes que la myosine elle-même.

Nous avons tout d'abord cru qu'il existait une seule métamyosine, commune au muscle fœtal et au muscle adulte, et seulement plus abondante dans le premier. Mais après avoir isolé cette protéine et étudié quelques propriétés physico-chimiques de ses solutions, nous avons constaté qu'il y avait au moins deux métamyosines fœtales et deux métamyosines adultes, distinctes. Il n'est pas exclu, cependant, que ce soient des formes différentes d'un même individu chimique.

C'est pourquoi, au cours de cet exposé, nous parlerons d'abord de « métamyosine » en général, pour distinguer ensuite les différentes protéines répondant à cette appellation.

Ces protéines sont différentes de toutes les protéines musculaires connues aujourd'hui, que nous venons de passer en revue. Nous le verrons dans un chapitre consacré à ce sujet, et en particulier, nous nous sommes attaché à distinguer la « métamyosine adulte » de la contractine de Dubuisson, dont les propriétés sont les plus voisines.

La métamyosine est sans doute identique à l'impureté dont Weber et Monmaerts (38-50) signalent la présence dans leurs préparations de myosine.

CHAPITRE II

DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISÉES

I. — TECHNIQUES CHIMIQUES.

1. PRÉPARATIONS DE LA MYOSINE.

A) Préparation de la myosine selon Mominaerts et Parrish (38).

Cette préparation consiste :

a) en une extraction de 15 minutes du broyat musculaire par une solution KCl 0.3 M, tampon phosphates K 0.15 M de pH 6.5;

b) en une purification de la myosine extraite par trois précipitations successives à faible force ionique et dissolutions en milieu salin concentré.

Résultats obtenus : Nous obtenons par cette méthode de préparation des solutions contenant d'après les analyses électrophorétiques, de la myosine accompagnée d'actomyosine et dans certains cas, de métamyosine.

La viscosité de ces préparations diminue sous l'action de l'ATP révélant ainsi la présence d'actomyosine.

Nous avons eu recours à cette préparation pour étudier les proportions relatives de métamyosine, de myosine et d'actomyosine extraites dans ces conditions à partir de différents muscles.

B) Préparation de la myosine selon Portzehl, Schramm et Weber (50).

Cette préparation commence par une extraction faite dans les mêmes conditions que dans la précédente technique, mais de dix minutes seulement. Elle comporte principalement une séparation de l'actomyosine par précipitation à la force ionique de 0.3, tandis que la myosine reste en solution.

Résultats obtenus : Nous obtenons, par cette technique, une solution de myosine exempte d'actomyosine, accompagnée de traces de composés que nous avons identifiés comme étant de la métamyosine et de la contractine et que Weber a négligés mais avait signalés. L'ATP n'a aucune action sur la viscosité de ces solutions.

Nous avons utilisé cette méthode pour préparer de la myosine exempte d'actomyosine et nous en avons retenu le principe de précipitation fractionnée de l'actomyosine pour nos préparations de métamyosine et de contractine.

Ces deux techniques de préparation de la myosine ont été appliquées sans variante au muscle fœtal : il faut noter cependant qu'un temps plus long séparait la mort de l'animal du début de l'extraction, dans le cas des fœtus de lapin du fait de la dissection très longue et très laborieuse, et dans le cas des fœtus de mouton du fait du transport des abattoirs au laboratoire.

2. DOSAGE DE L'AZOTE

Les dosages d'azote total sont faits selon la méthode de Parnas modifiée par Dumazert avec une solution HCl N/35 qui, grâce à la micro-burette de Dallemagne, permet une précision de 0,5 μg N.

On adopte le coefficient 6,2 pour passer de la concentration en azote à la concentration protéinique, puisque la myosine contient 16,2 p. cent d'azote d'après les analyses de Mommaerts et Szent-Gyorgyi (62). Nous avons adopté provisoirement le même coefficient pour les autres protéines étudiées.

3. DOSAGE DU PHOSPHORE

Le dosage du phosphore est fait selon Fiske et Subarow (20).

4. DOSAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES

Le dosage des acides nucléiques est fait selon la technique d'Ogur et Rosen (45).

Nous appliquons ce dosage aux protéines précipitées par dilution aqueuse de nos solutions (de 10 à 50 mg). Nous lisons au spectrophotomètre à 260 m μ la densité optique de l'extrait par ClO_4H N contenant les acides ribonucléiques, et de l'extrait par ClO_4H 0,5 N contenant les acides désoxyribonucléiques.

Nous avons adopté 0,350 pour coefficient d'absorption d'1 μg de phosphore ribonucléique et 0,280 pour 1 μg de phosphore désoxyribonucléique, d'après les déterminations d'Ogur et Rosen, d'Hamoir (24) et les résultats que nous avons obtenus par les dosages du ribose et du désoxyribose.

5. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ACIDE ADÉNYLIQUE DÉSAMINASIQUE

Le dosage de l'activité acide adénylique désaminasique est fait selon Kalekar (29).

On exprime l'activité de la solution par la variation de densité optique ($\times 1000$) à 265 m μ pendant 5 minutes, par μg de protéines à 27°, au pH 5,9, en présence de 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'acide adénylique.

6. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ATPASIQUE

Le dosage de l'activité ATPasique est fait selon Perry (48). On dose le phosphore libéré de 300 μg d'ATP par la méthode de Fiske et Subarow (20), pendant 5 minutes, à 37° C, par 100 μg d'enzyme, dans un tampon glycocolle 0,5 M pH 9,2, en présence de CaCl_2 (0,003 M).

II. — TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES.

I. ELECTROPHORÈSE

L'appareil utilisé pour ce travail est du type aujourd'hui classique, préconisé par Tiselius.

Les expériences sont faites à $+ 2^{\circ} \text{C}$.

L'appareil est muni de deux systèmes optiques. L'un est le système classique à diagramme direct décrit par Svenson (58-59) qui donne les courbes de gradient de concentration. Le deuxième, auquel on peut passer à partir du premier sans changements importants, comme l'a montré le premier Svenson (61), utilise le même principe que les mesures interférométriques de Rayleigh et donne les courbes de concentration. Il a été décrit, tel qu'il a été utilisé ici, par Wiedemann (75). L'intérêt principal de ce deuxième système optique est sa plus grande sensibilité qui permet de travailler en milieu plus dilué et d'économiser une matière première souvent précieuse. De plus, il est souvent avantageux de pouvoir travailler en milieu moins concentré, donc moins visqueux et moins opaque, dans le cas de certaines protéines comme l'actomyosine, dont l'analyse électrophorétique à 0,6 g p. cent est impossible.

Étant donnée la solubilité particulière des protéines étudiées ici, nous avons dû utiliser des tampons de grande force ionique, de faible résistance électrique. Nous avons dû mettre en série avec la cellule une résistance pour compenser la trop grande conductivité des tampons.

Une dialyse prolongée de la solution de protéines contre le tampon (2 jours) permet une égalisation satisfaisante des conductivités.

Le calcul de la mobilité et la détermination des proportions relatives des différents constituants sont faits selon les procédés classiques.

Les erreurs commises sur la détermination du champ et du temps sont négligeables devant l'erreur commise sur celle du déplacement de la protéine (1 p. cent). En fait, si l'on peut atteindre la précision de 1 p. cent entre deux mesures d'une même solution, la dispersion des mesures est beaucoup plus grande quand on s'adresse à des préparations différentes faites à partir d'animaux distincts, car vient s'ajouter un facteur de dispersion biologique.

La viscosité des solutions analysées ne perturbe pas la mobilité des différents constituants d'une même frontière, d'une solution à une autre (nous avons obtenu les mêmes résultats pour des concentrations de 0,1 et de 0,8 p. cent). Mais elle peut expliquer les différences observées entre les deux frontières.

Nous n'avons jamais eu d'accident δ ou ϵ , ce que la grande force ionique des tampons utilisés suffit à expliquer (60).

Nous avons d'autre part remarqué qu'il y avait une meilleure séparation des constituants à la frontière ascendante. Ceci peut s'expliquer par le fait que la diffusion y est moins rapide, étant contrariée par le gradient du champ, contrairement à ce qui se passe à la frontière descendante. Les chiffres que nous donnerons dans ce travail se rapportent à la frontière ascendante.

2. VISCOSIMÉTRIE

Nous avons utilisé un viscosimètre de type pipette d'Ostwald (fig. 2).

La pipette s'adapte par un rodage à un réservoir. Le tout est hermétique et peut être immergé dans l'eau d'un thermostat. De plus, la récupération de l'échantillon après la mesure est très facile.



Hauteur du capillaire : 13,8 cm.

Diamètre du capillaire : 0,47 mm.

Hauteur moyenne de la dénivellation : 19,5 cm.

Volume du liquide s'écoulant pendant la mesure : 1 ml.

Volume introduit dans le réservoir : 2 ml.

Température du thermostat : 2° C.

Temps d'écoulement du solvant à 2° : 2 min. environ.

Gradient de vitesse moyen pour le solvant :

$$\beta = \frac{8 V}{3\pi r^3 t} = 85 \text{ sec}^{-1},$$

d'après Kroepelin (33).

Nous exprimons les résultats en viscosité spécifique en négligeant les très faibles différences de densité existant entre le solvant et la solution de protéine étudiée :

FIG. 2.
Viscosimètre

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_{\text{solvant}}}{t_{\text{solvant}}} = \eta_{rel} - 1$$

Nous pouvons déduire de nos mesures de viscosité spécifique la viscosité intrinsèque de la protéine étudiée, ou, au moins, une valeur approchée de cette caractéristique, en extrapolant pour une concentration nulle

la valeur de $\left[\frac{\eta_{sp}}{c} \right]$.

$$[\eta]_i = \left[\frac{\eta_{sp}}{c} \right]_{c \rightarrow 0} \simeq \left[\frac{\eta_{sp}}{c} \right]_{c \rightarrow 0} \quad (c \text{ exprimé en g/ml ou g/100 ml})$$

grad. de vitesse $\rightarrow 0$

La viscosité intrinsèque déterminée, d'après nos mesures, à titre de vérification, pour la myosine est en plein accord avec les chiffres trouvés

dans la littérature $\left[\frac{\eta_{sp}}{c \text{ g/ml}} \right]_{c \rightarrow 0} = 230$.

3. ANALYSE DES SOLUTIONS DE PROTÉINES PAR LES COURBES DE SOLUBILITÉ

Nous avons adapté à la métamyosine en la transformant la technique décrite par Derrien (11) : nous avons analysé nos préparations dans une solution acétate Na, tamponnée, entre 0,4 M et 0,02 M, à 0°C. Notons

que la précipitation des protéines étudiées est obtenue par dilution aqueuse de la solution saline et non par relargage.

Voici le détail de cette méthode :

Les protéines à analyser sont dissoutes dans une solution acétate Na, phosphates Na, de pH 7,5, dont on connaît avec précision la concentration saline.

On dose également l'azote protéinique de cette solution. On prépare une série de flacons contenant un même volume de solutions acétate Na, phosphates Na, pH 7,5, de concentrations variables, comprises entre 0,4 M et 0,02 M acétate Na à partir d'une solution-mère (acétate Na 0,85 M, $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ 0,045 M, PO_4NaH_2 0,005 M) et d'eau bidistillée mesurées avec des burettes étalons au 1/50^e de ml. Deux points consécutifs sont séparés de 0,01 M environ.

Les flacons sont mis à refroidir dans de la glace fondante. Puis on ajoute dans chaque flacon le même volume de solution de protéines, de sorte que la concentration finale en azote protéinique soit 100 μ g/ml. Le volume total est de 10 ml, 5 ml ou 3 ml. On tiendra compte de la quantité de sels introduits en même temps que la protéine pour le calcul de la concentration saline finale.

On laisse l'équilibre s'établir pendant 48 heures dans la glace fondante. Nous avons vérifié que ce temps est suffisant.

Après ce temps, les solutions sont rapidement centrifugées au froid et on dose l'azote contenu dans le surnageant.

On peut alors tracer la courbe de la concentration des protéines dans le surnageant en fonction de la concentration saline : $S = f(c)$,

ds

et la courbe dérivée : $\frac{ds}{dc} = f'(c)$.

dc

CHAPITRE III

OBSERVATION DE LA MÉTAMYOSINE

I. — PREMIERES OBSERVATIONS CHEZ LE FOETUS ET L'ADULTE (LAPIN et MOUTON).

Nous avons tout d'abord observé la métamyosine en analysant à l'électrophorèse des préparations de « myosine » faites selon la technique de Mommaerts et Parrish (38) à partir de muscles de foetus de lapins à terme. Ces analyses étaient faites dans un tampon NaCl 0,25 M, PO_4NaH_2 0,032 M, $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ 0,004 M, pH 7,1, $\mu = 0,35$, dans un champ de 1,2 V/cm, pendant 22 heures à 2° C.

Nous observons la présence d'une protéine plus lente que la myosine et l'actomyosine, en quantités notables (fig. 3).

Nous reportons dans le tableau I les proportions de métamyosine trouvées dans 7 préparations faites à partir de 7 portées différentes.

TABLEAU I. — *Pourcentage de métamyosine dans les préparations fœtales*

NUMERO D'ÉLECTRO- PHORÈSE	FŒTUS DE LAPIN NUMÉRO	POURCENTAGE DE MÉTAMYOSINE DANS LES PRÉPARATIONS FAITES SELON MOMMAERTS
		FRONTIÈRE ASCENDANTE
119	L. 533	21
112	L. 531	29,5
103	L. 529	8
101	L. 530	12 %
98	L. 528	24 %
93 et 95	L. 526	27 % — 32 %
85 et 86	L. 522	10 % — 16 %

Les chiffres trouvés sont donc compris entre 8 et 30 p. cent. Les différences d'une portée à l'autre peuvent s'expliquer par le fait que les foetus ont été sacrifiés plus ou moins près du terme, à quelques jours près, ce qui peut ne pas être négligeable chez le lapin, où la gestation ne dure que 28 jours.

Sur la frontière descendante, la métamyosine est souvent mal séparée et difficilement mesurable.

Par contre, dans les préparations faites de la même façon à partir de

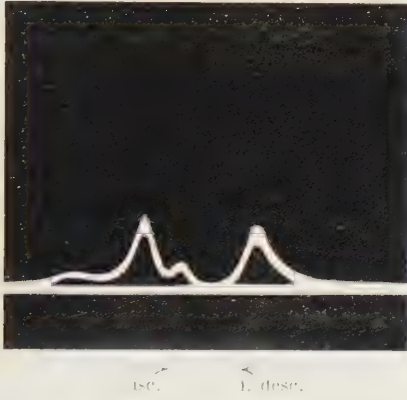


FIG. 3. — L. 533 — Fœtus de lapin.
Préparation selon Mommaerts
Après 76.800 secondes
Sur la frontière ascendante, de gauche à droite: Métamyosine Myosine
Actomyosine

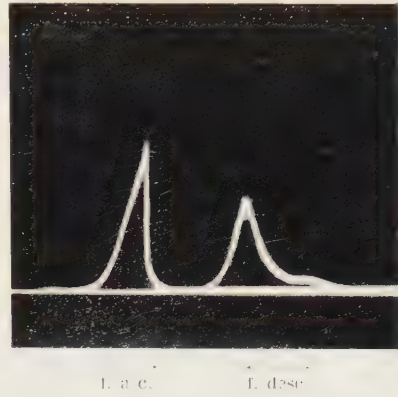


FIG. 4. — L. 526 - Lapin adulte.
Préparation selon Mommaerts
Après 80.300 secondes

muscles adultes, nous ne retrouvons pas de pic correspondant dans la même zone de mobilité, ou bien un très léger accident sur la frontière ascendante, plus net parfois sur la frontière descendante (fig. 4), tableau II.

TABLEAU II. — Pourcentage de métamyosine dans les préparations adultes.

NUMERO D'ÉLECTRO PHORÈSE	NUMÉRO DES LAPINS ADULTES	POURCENTAGE DE METAMYOSINE DANS LES PRÉPARATIONS SELON MOMMAERTS	
		FRONTIÈRE ASCENDANTE	FRONTIÈRE DESCENDANTE
118	L. 532	0	6
111	L. 531	traces	
102	L. 529	0	
96	L. 526	traces ?	5
79	L. 520	0	traces

Des observations tout à fait parallèles sont faites sur des préparations de mouton.

Chez l'adulte : pas de métamyosine observable dans la préparation analysée (fig. 5).

Chez le fœtus : Nous observons un pic de métamyosine pouvant atteindre 34 p. cent des protéines présentes dans la préparation, sur la frontière ascendante. A la frontière descendante, les différents constituants ne sont pas séparés (fig. 6).

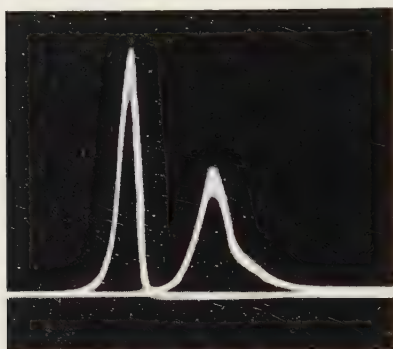


FIG. 5. — M. 2 - Adulte.
Préparation selon Mommaerts.
Après 77.800 secondes

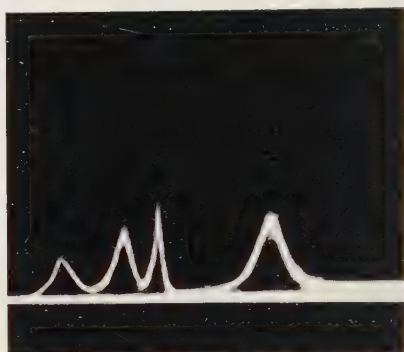


FIG. 6. — M. 1 - Fœtus de mouton.
Préparation selon Mommaerts
Après 77.900 secondes

II. — EVOLUTION QUANTITATIVE DE LA METAMYOSINE AU COURS DE LA VIE FOETALE.

Les différences observées entre les proportions de métamyosine extraite du muscle adulte et du muscle fœtal, nous ont incité à rechercher s'il

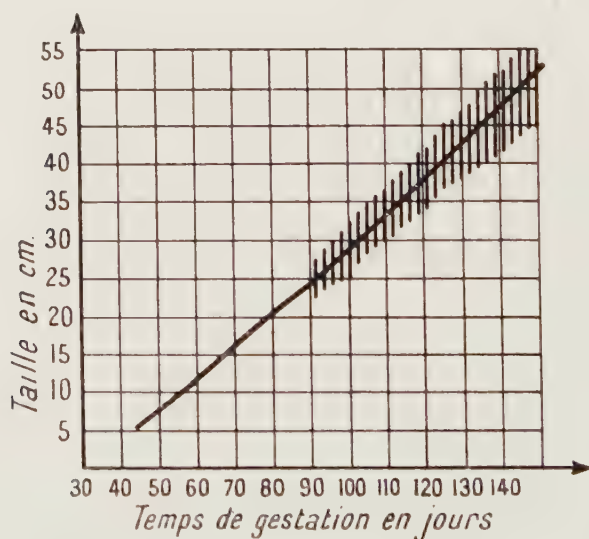


FIG. 7. — Taille des fœtus de mouton au cours de la vie intrautérine

y avait une évolution au cours de la vie fœtale elle-même et nous nous sommes adressé au fœtus de mouton, matériel commode pour cette étude.

La gestation chez le mouton dure 150 jours, mais nous n'avons pas pu nous procurer de fœtus avant le 82^e jour. Nous déterminons l'âge du fœtus d'après son poids et surtout d'après sa taille, en nous référant au livre de Barcroft « Researches on prenatal life » (3). La taille est mesurée entre le sommet du crâne et la naissance de la queue. Elle est le meilleur critère, d'après Barcroft, car elle est moins influencée que le poids par des facteurs individuels ou par la gemellité (fig. 7 et tableau III).

TABLEAU III. — *Poids des fœtus de mouton au cours de la vie intrautérine*

AGE DU FŒTUS	POIDS	
60 jours	100 g	à 25 % près
70 —	200 g	
80 —	300 g	
85 —	400 g	
90 —	500 g	
100 —	700 g à 1,000 kg	
110 —	1,000 à 1,500 kg	
120 —	1,600 à 2,500 kg	
130 —	1,900 à 3,500 kg	
140 —	2,000 à 4,500 kg	

Nous reportons dans le tableau IV les résultats obtenus dans cette étude.

TABLEAU IV. — *Quantités de métamyosine obtenues dans les préparations faites selon Mommaerts en pour cent des protéines totales au cours de la vie fœtale*

N° DU FŒTUS DE MOUTON	MENSURATIONS	AGE PRÉSUMÉ	POURCENTAGE DE MÉTAMYOSINE
M. 7	3,450 kg — 48 cm	140 jours	8,7 %
M. 8 N° 1	2,510 kg — 45 cm	135 —	6 —
M. 8 N° 5	2,200 kg — 46 cm	135 —	8,8 —
M. 8 N° 6	1,680 kg — 41 cm	125 —	15 -
M. 5	1,750 kg — 37 cm	120 —	27,5 -
M. 5	600 g — 27 cm	95 —	34,5 —
M. 7	365 g — 21 cm	82 —	37,6 —

D'après la courbe (fig. 8), il y a donc une diminution progressive du pourcentage de métamyosine extraite dans les conditions de la technique de Mommaerts et Parrish.

Ceci reflète une évolution de la composition protéinique de la myofibrille musculaire fœtale, à moins que ce ne soit l'extractibilité de cette protéine qui change au cours de la vie fœtale.

L'évolution est particulièrement accentuée entre le 120^e et le 130^e jour de la gestation. En supposant qu'il se passe la même chose chez les fœtus de lapins, et en tenant compte des durées relatives des vies fœtales, notre

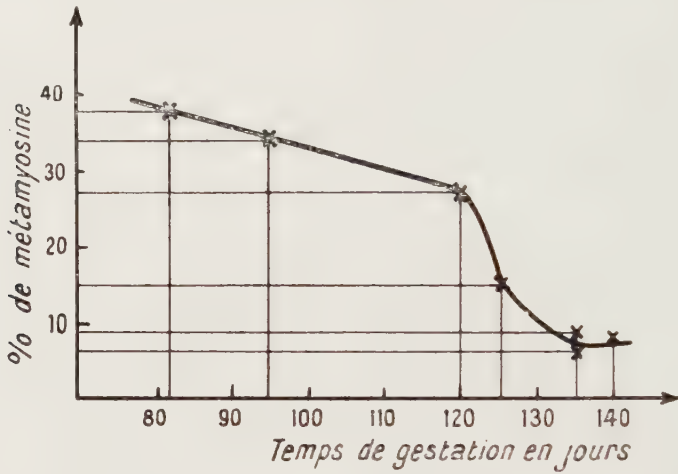


FIG. 8. — Pourcentage de métamyosine contenu dans les préparations faites selon Mommaerts en fonction de l'âge du fœtus

remarque sur l'origine de la dispersion des chiffres se rapportant aux quantités de métamyosine extraite chez les fœtus de lapins sacrifiés quelques jours avant le terme se trouverait justifiée.

Cette évolution suggère que la métamyosine pourrait jouer un rôle de précurseur vis-à-vis de la myosine.

CHAPITRE IV

ISOLEMENT DE LA MÉTAMYOSINE

I. — PRINCIPLE

Deux propriétés de la métamyosine nous ont permis de la purifier :

1. LA MÉTAMYOSINE EST SOLUBLE A LA FORCE IONIQUE DE 0,3

si bien que, dans la précipitation fractionnée de l'actomyosine à $\mu = 0,3$ que comporte la technique de préparation de Portzehl, Schramm et Weber (50), la métamyosine reste en solution avec la myosine. Ce procédé nous permet donc un enrichissement de nos préparations en métamyosine, par élimination de l'actomyosine.

C'est ainsi qu'une solution contenant de l'actomyosine, de la myosine et 8 p. 100 de métamyosine, résultat d'une préparation selon Mommaerts et Parrish à partir de muscles de fœtus de lapin, dont on précipite l'actomyosine à $\mu = 0,3$ selon Weber, contient ensuite de la myosine et 55 p. 100 de métamyosine.

Si nous appliquons la technique de préparation de Weber au muscle adulte, nous obtenons de la myosine accompagnée d'une protéine dans une zone de mobilité correspondant à la métamyosine, visible sur les deux frontières. Grâce à ce premier enrichissement, il nous apparaissait donc que le muscle adulte, quoique beaucoup moins riche, contenait également une protéine correspondant à la métamyosine du muscle fœtal (fig. 9)

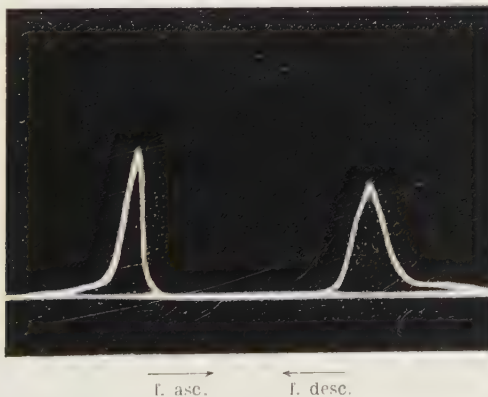


FIG. 9. — L. 571 - Lapin adulte. Préparation selon Weber après 73.000 secondes
Métamyosine, Myosine

Entre la métamyosine et la myosine, on observe souvent un pic dont la mobilité permet de l'identifier à la myosine γ ou contractine de Dubuisson (fig. 10).

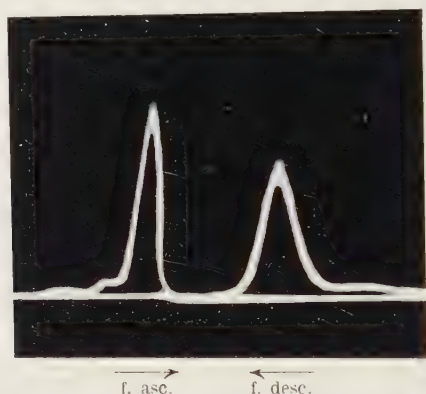


FIG. 10. — L. 550 - Lapin adulte. Préparation selon Weber après 80.000 secondes
Sur la frontière ascendante de gauche à droite : Métamyosine, Contractine, Myosine.

2. LA MÉTAMYOSINE EST EXTRACTIBLE EN ABSENCE D'ATP

par la solution d'extraction KCl 0,3 M, phosphates K 0,15 M, pH 6,5. Elle se distingue par cette propriété de la myosine, pratiquement inextractible en l'absence d'ATP et de la contractine, difficilement extraite par cette solution d'extraction, même de muscles contracturés. Par contre, l'actomyosine s'extraît aussi du muscle en l'absence d'ATP par cette solution.

La combinaison de ces deux propriétés pouvait nous laisser espérer l'isolement de la métamyosine. Il suffisait en effet de réaliser d'abord une extraction en absence d'ATP par la solution d'extraction KCl 0,3 M, phosphates K 0,15 M, pH 6,5 qui nous donnait un mélange d'actomyosine et de métamyosine, que nous pourrions séparer ensuite par leurs différentes propriétés de solubilité à la force ionique de 0,3.

Nous avons expérimenté plusieurs façons de réaliser l'extraction en absence d'ATP : extraction prolongée pendant 24 heures ou extraction de muscles en état de rigor mortis, puis lavages du broyat musculaire avant l'extraction.

C'est ce dernier procédé que nous avons finalement adopté et que nous décrirons en détail. Il est inspiré de la technique de préparation de la myosine selon A. G. Szent-Györgyi (64), où le broyat musculaire est lavé pour éliminer toute trace d'ATP avant l'extraction par l'iodure de potassium.

Enfin, au cours de la mise au point de la technique de préparation de la métamyosine, nous nous sommes rendu compte que la séparation complète de l'actomyosine demande la répétition de la précipitation fractionnée au moins deux fois.

II. — DESCRIPTION DE LA METHODE DE PREPARATION DE LA METAMYOSINE.

Cette technique a été mise au point sur des muscles adultes et fœtaux et s'applique indifféremment aux deux.

L'animal est sacrifié, et les muscles sont prélevés comme dans la technique de préparation de la myosine selon Mommaerts et Parrish (38). A partir de ce moment, toutes les opérations doivent être faites au froid, à moins de 5° C. et avec des réactifs et des appareils refroidis. Les muscles sont broyés au broyeur de Latapie. Le broyat musculaire est agité 15 minutes avec un volume d'eau bidistillée froide égal en ml à 3 fois son poids en grammes. Le liquide est éliminé par centrifugation. On répète cette opération sur le résidu musculaire. Ensuite, le broyat musculaire est agité de la même façon pendant 15 minutes avec le même volume d'une solution KCl 0,05 M refroidie. On répète cette opération.

Le résidu de ces lavages est extrait par 3 volumes de la solution d'extraction (KCl 0,3 M, phosphates K 0,15 M, $\mu = 0,6$, pH 6,5) pendant une demi-heure en agitant à l'agitateur horizontal. On centrifuge et l'extrait est précipité par 14 volumes d'eau comme dans la technique de Weber. Le précipité est centrifugé et dissous dans la solution d'extraction diluée au 2/3 : la force ionique est alors de 0,4. Ensuite on procède à la précipitation fractionnée de l'actomyosine en amenant la solution à la force ionique de 0,3, en ajoutant lentement de l'eau et en agitant. On élimine le précipité d'actomyosine par une centrifugation d'une demi-heure à grande vitesse (4.000 g environ). Le surnageant contient la métamyosine que l'on précipite par dilution aqueuse jusqu'à une force ionique de 0,04 μ . On redissout le précipité de métamyosine dans la solution d'extraction diluée aux 2/3 et on répète la précipitation fractionnée de l'actomyosine au moins une seconde fois.

A la fin, on dissout le précipité de métamyosine dans la solution saline désirée (généralement KCl 0,4 M, tampon phosphates K 0,05 M, pH 6,8).

III. — RENDEMENT.

Le rendement est médiocre. On obtient 0,5 mg environ de protéines par gramme de muscles frais chez l'adulte et environ 1 mg par g. de muscles frais chez le fœtus.

IV. — IMPURETES.

1. MYOSINE

Il n'y a généralement pas de myosine dans nos préparations. Sa présence accidentelle (dans une expérience), s'explique par une mauvaise élimination de l'ATP avant l'extraction.

2. CONTRACTINE

La contractine s'extrait mal par la solution KCl 0,3 M, phosphates K 0,15 M, pH 6,5 utilisée ici. Nous avons cependant obtenu dans un cas une grande proportion de contractine pour une raison inexplicable.

3. TROPOMYOSINE

Nous avons remarqué quelquefois la présence de quelques pour cent d'une protéine plus rapide que la myosine, dont la mobilité est de $-4.5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{Sec.}$ au pH 7,1, ce qui pourrait l'identifier à la *tropomyosine*.

4. ACIDES NUCLÉIQUES

Nous verrons également, dans un prochain chapitre, que nos préparations renferment des *acides nucléiques*.

CHAPITRE V

ETUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS DES PRÉPARATIONS DE MÉTAMYOSINE

Cette étude nous a révélé l'hétérogénéité de la protéine étudiée, dont nous avons dû distinguer plusieurs formes, de propriétés distinctes.

I. — ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE.

A. ELECTROPHORÈSE

Si nous examinons les valeurs des mobilités trouvées au pH 7,1 pour la métamyosine, dans les préparations de « myosine » et au cours des essais de mise au point de la technique de préparation, nous remarquons la grande dispersion de ces chiffres qui vont de $-1,1 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec à $-2,0$. Cette grande dispersion se trouve considérablement réduite si l'on considère séparément les valeurs trouvées pour les métamyosines d'origine adulte et les métamyosines d'origine fœtale. A quelques exceptions près, les premières se situent au-dessus de $-1,6 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec et les deuxièmes au-dessous. Cette distinction entre deux types de métamyosine se trouve confirmée par le fait que certaines préparations présentent en même temps les deux pics : mais alors que la métamyosine lente prédomine presque toujours dans les préparations fœtales, la métamyosine rapide au contraire est plus abondante ou même seule dans les préparations d'origine adulte.

Nous avons réuni dans le tableau V les valeurs obtenues pour les deux types de métamyosine préparés selon la technique que nous avons décrite. La concordance est bonne entre les valeurs trouvées pour chacun des deux pics dans les préparations d'origine adulte et d'origine fœtale. Seules leurs proportions relatives sont différentes :

Nous avons observé en effet :

a) dans les préparations d'origine adulte: de 75 à 100 p. 100 de métamyosine rapide et de 0 à 25 p. 100 de métamyosine lente;

b) dans les préparations d'origine fœtale: de 30 à 80 p. 100 de métamyosine lente et de 20 à 70 p. 100 de métamyosine rapide.

Les préparations d'origine fœtale étant faites à partir de muscles provenant de plusieurs portées de fœtus, il n'est pas possible de savoir s'il y a une dépendance entre la quantité de métamyosine rapide et le degré de maturité du fœtus.

Les mesures ont été faites à 2° C. avec un champ de 1,2 V/cm. La durée de l'électrophorèse est de 22 heures environ. La concentration en protéines

est de 0,2 g p. 100 ou de 0,8 g p. 100 suivant le système optique utilisé. Le pH est de 7,1. Le tampon contient NaCl 0,25 M. ou 0,35 M. $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ 0,032 M et PO_4Na_2 0,04 M.

TABLEAU V. — *Mobilités trouvées pour la métamyosine au pH 7,1 dans les préparations faites selon la technique adoptée en définitive et proportions relatives des deux constituants*

TYPE D'ANIMAL	N°	N° D'EXP.	pH	MOBILITÉS ET POURCENTAGES			
				MÉTAMYOSINE LENTE		MÉTAMYOSINE RAPIDE	
				$10^{-5}\text{cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$	p. 100	$10^{-5}\text{cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$	p. 100
Fœtus de mouton	M. 4	162	7,12	- 1,44	80	- 1,90	20
»	M. 5	168	7,12	- 1,43	65	- 1,90	35
»	M. 7	180	7,05	- 1,2	33	- 1,85	67
»	M. 9	237	7,05	- 0,8	50	- 1,85	50
»	M. 10	242	7,15	- 1,2	75	- 1,7	25
»	M. 12	252	7,05	- 1,45	60	- 2,1	40
Fœtus de lapin	L. 554	174	7,15	- 1,3	60	- 1,85	40
Lapins nouveau-nés	L. 551	164	7,05	- 1,1	—	- 1,8	—
Fœtus de lapin	L. 557	183	7,0	- 1,3	60	- 1,9	40
Mouton adulte	M. 6	170	7,10	- 1,2	—	- 1,85	—
»	M. 11	250	7,10	0	0	- 1,80	100
»	M. 13	262	7,05	0	0	- 1,95	100
Lapin adulte	L. 555	172	7,1	- 1,4	24	- 1,8	76
»	L. 557	182	7,1	0	0	- 1,85	100
»	L. 565	226	7,1	0	0	- 1,95	100
»	L. 566	232	7,1	0	0	- 1,68	100
»	L. 569	267	7,13	0	0	- 1,75	100
»	L. 572	282	7,1	- 1,5	20	- 1,8	80

Exemples d'images électrophorétiques obtenues sur des préparations de métamyosine :

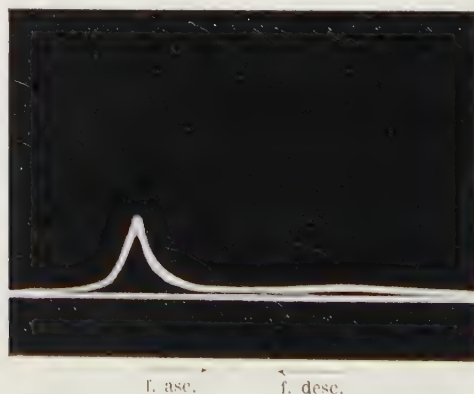
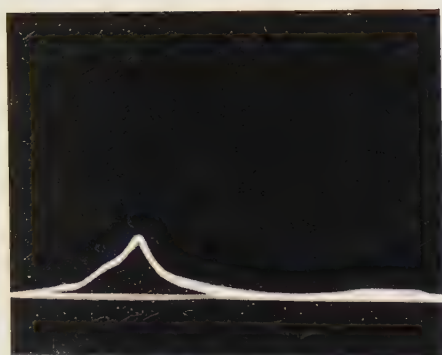
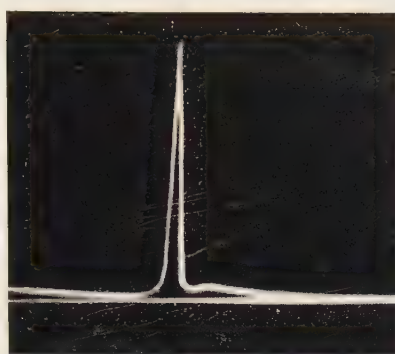


FIG. 11. — Lapin adulte, N° 540, pH 7,1. Après 80.000 secondes
Frontière ascendante: 1 pic de mobilité, — $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$ (Métamyosine)
(1 pic de mobilité, — $4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$ (Tropomyosine ?)



f. asc. f. desc.

FIG. 12. — Lapin adulte, N° 555,
pH 7,1. Après 78.200 secondes
Frontière ascendante : 2 pics de
mobilité. — $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec}$ et
 $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec}$. (Métamyosine,
présence de Myosine et de
Tropomyosine ?)



f. asc. f. desc.

FIG. 13. — Fœtus de mouton, M. 4,
pH 7,1. Après 80.000 secondes
Frontière ascendante : 2 pics de
mobilité. — $1,45 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec}$. et
 $1,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec}$. (Métamyosine)

Mobilité en fonction du pH et détermination du point isoélectrique.

Nous avons fait cette étude sur la métamyosine rapide, d'origine adulte, chez le lapin, en vue de la distinguer par son point isoélectrique d'autres protéines musculaires, comme nous le verrons plus loin.

Nous avons fait les mesures de mobilité dans des tampons NaCl 0,35 M, Phosphates Na 0,05 M, ou acétate Na 0,05 M, suivant le pH désiré. Le champ était environ de 1 V/cm.

Cette étude a été rendue difficile par la faible solubilité de la métamyosine, en dessous du pH 5,9 : nous avons dû systématiquement employer le système optique interférométrique seul utilisable avec les faibles concentrations en protéines encore en solution dans ces conditions.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau VI.

TABLEAU VI. — *Mobilité de la métamyosine en fonction du pH*

N° DE L'ANIMAL	N° D'EXP.	pH	MOBILITÉ
L. 563	217	8,25	- 2,2
L. 558	192	7,70	- 1,9
		7,10	- 1,8
L. 558	193	6,45	- 1,2
L. 563	216	5,92	- 0,85
L. 568	261	5,55	- 0,65
L. 569	269	5,35	- 0,5
L. 566	233	5,0	- 0,4

Le point isoélectrique, dans ces conditions expérimentales, se trouve donc vers le pH 5,1-5,2, plus bas que celui de la myosine déterminé dans des conditions voisines (17) vers 5,3-5,4.

Nous montrons, dans un graphique, la courbe de mobilité en fonction du pH de la métamyosine comparée à celle de la myosine d'après Erdos et Snellmann (fig. 14).

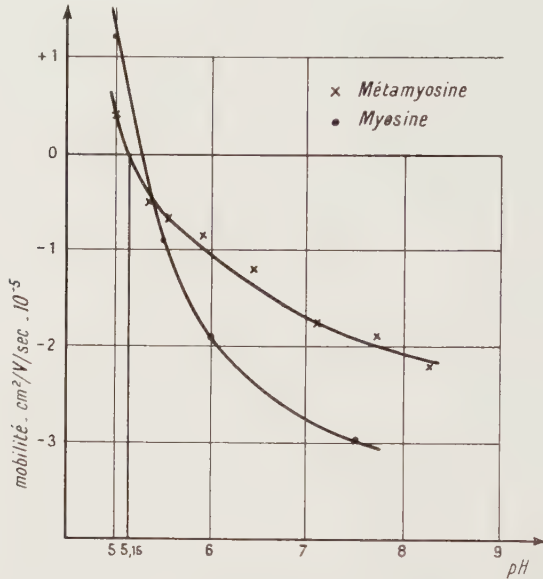


FIG. 14. — Mobilité de la métamyosine (lapins adultes), en fonction du pH

B. VISCOSIMÉTRIE

L'étude systématique de la viscosité de nos préparations de métamyosine nous conduit à des conclusions parallèles à celles que nous avons tirées de l'étude électrophorétique : hétérogénéité de la protéine étudiée et opposition des propriétés physico-chimiques des préparations d'origines fœtale et adulte.

1. Préparations d'origine adulte (lapin et mouton).

Toutes les préparations de métamyosine ont une viscosité plus faible que la myosine. Nous reproduisons sur un diagramme les valeurs trouvées en viscosités spécifiques pour les différentes préparations en fonction de leurs concentrations en µg d'azote protéinique par ml, ainsi que la courbe de viscosité de la myosine, à titre de comparaison. Nous remarquons que ces points se situent dans une zone assez mal définie (fig. 15).

Pour les préparations de métamyosine adulte, la valeur moyenne de la viscosité spécifique par gramme par ml extrapolée pour une concentration nulle est de 80 :

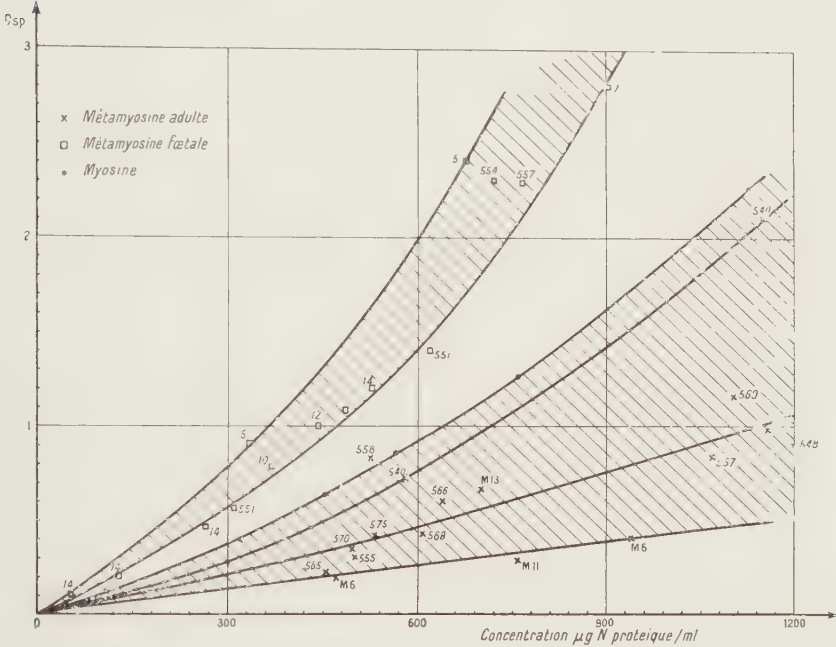
$$\left[\frac{\eta_{sp}}{c \text{ g/ml}} \right]_{c \rightarrow 0} = 80 \text{ (70 à 100)}$$

2. Préparations d'origine fœtale (lapin et mouton).

La viscosité de ces préparations est toujours beaucoup plus élevée que celle des préparations adultes :

$$\left[\frac{\eta_{sp}}{C \text{ g/ml}} \right]_{C \rightarrow 0} = 260 \text{ (220 à 300)}$$

La présence d'importantes quantités d'acides nucléiques au sein de ces



La viscosité de la métamyosine n'est pas modifiée par l'action de l'ATP.

TABLEAU VII. — *Action de l'ATP sur la viscosité des solutions de métamyosine*

PRÉPARATION	CONC. µ g N/ml	TEMPS D'ÉCOULEMENT		DIFFÉRENCE
		AVANT ATP	APRÈS ATP	
Lapin 558 adulte	584	4 min, 10 sec.	4 min, 6 sec.	8 sec.
Mouton 6 adulte	942	3 min, 10 sec.	3 min, 10 sec.	0 sec.
Fœtus de lapin 551	309	3 min, 40 sec.	3 min, 32 sec.	8 sec.
Fœtus de lapin 554	718	7 min, 38 sec.	7 min, 30 sec.	8 sec.
Fœtus de mouton 5	335	4 min, 27 sec.	4 min, 20 sec.	7 sec.
Fœtus de mouton 12	442	5 min, 57 sec.	5 min, 48 sec.	9 sec.

Le fait que l'adjonction d'ATP dissous dans une goutte de tampon dilue la solution, et le fait que l'on réchauffe obligatoirement la solution pendant cette opération, rendent compte des 8 secondes d'écart généralement observées entre les deux mesures. On retrouve le même écart quand on ajoute une goutte de tampon sans ATP.

Action de l'actine.

L'addition d'actine, préparée selon la technique de Straub, Feuer, Molnar et Pettko (19), sans purification postérieure, et polymérisée selon la technique de Andrew Szent-Gyorgyi (64), à une solution de métamyosine, dans les conditions décrites par Andrew Szent-Gyorgyi pour la synthèse de l'actine et de la myosine en actomyosine (64), ne donne pas lieu à la formation d'un complexe dissociable par l'ATP (tableau VIII). Ces conditions sont les suivantes: KCl 0.6 M, tampon phosphates 0.067 M, pH 7.0, température de 20° C.

TABLEAU VIII. — *Action de l'ATP sur les solutions de myosine et de métamyosine additionnées d'actine*

N° DE L'ANIMAL	MÉTA-MYOSINE	MYOSINE	ACTINE	TEMPS D'ÉCOULEMENT	
				SANS ATP	APRÈS ATP
L. 557		15 mg		2 min, 6 sec.	2 min, 2 sec.
L. 557		15 mg	3 mg	3 min, 36 sec.	2 min, 18 sec.
L. 557	15 mg		3 mg	1 min, 48 sec.	1 min, 46 sec.
L. 556	15 mg		3 mg	1 min, 54 sec.	1 min, 52 sec.

Contrairement à ce qui se passe pour la myosine, l'ATP n'a pas d'action sur le mélange métamyosine-actine. De plus, nous avons vérifié qu'aucun complexe, non dissociable par l'ATP, ne se forme entre les deux protéines, la viscosité du mélange étant voisine de la somme des viscosités des deux protéines séparées (tableau IX).

Ces expériences ont porté uniquement sur la métamyosine de lapin adulte.

TABLEAU IX. — *Viscosité des mélanges myosine-actine et métamyosine-actine en fonction de la viscosité des constituants*

N° DE L'ANIMAL	MÉTA-MYOSINE	MYOSINE	ACTINE	VISCOSITÉ SPÉCIFIQUE	
				SANS ATP	APRÈS ATP
L. 571		13,2 mg 13,3 mg	3,2 mg	0,34	0,34
				0,47	0,45
			3,2 mg	4,95	0,90
	11,6 mg 11,6 mg				(au lieu de 0,79)
				0,10	0,10
			3,2 mg	0,53	0,50
					(au lieu de 0,44)

C. — ETUDE DE LA SOLUBILITE DE LA METAMYOSINE DANS DES SOLUTIONS D'ACETATE DE SODIUM.

Ayant constaté l'hétérogénéité de nos préparations de métamyosine par viscosimétrie et par électrophorèse, nous avons cherché à les analyser par l'étude de leurs courbes de solubilité. Cette étude n'a pu être faite pour la métamyosine extraite des fœtus de lapins, en raison des trop petites quantités de muscle disponible.

Les courbes que nous avons obtenues pour la métamyosine extraite des muscles de lapins adultes et de moutons adultes et fœtaux présentent plusieurs zones de précipitation entre 0,3 M et 0,02 M acétate de sodium. Nous en avons dénombré cinq qui ne se retrouvent pas toujours toutes dans chaque préparation et dont les proportions relatives varient d'une

TABLEAU X. — *Limites des zones de précipitation des différentes fractions (en molarité d'acétate de sodium) et quantités de protéines précipitées en µg N*

	I							II		III	
	I a	µgN	I b	µgN	I c	µgN	I µgN	II	µgN	III	µgN
L. 558	—	—	0,260-0,210	13	0,210-0,170	14	27	0,170-0,110	35	0,100-0,01	31
L. 559	0,300-0,260	4	0,240-0,180	13	—	—	17	0,180-0,115	34	0,100-0,01	44
L. 560	0,275-0,250	5	0,235-0,200	6	0,200-0,155	12	23	0,160-0,125	20	0,100-0,01	35
L. 566	—	—	0,240-0,200	10	—	—	10	0,175-0,110	41	0,100-0,01	39
L. 568	—	—	—	—	0,220-0,150	18	18	0,145-0,100	20	0,100-0,01	43
M. 11	0,275-0,240	3	0,235-0,200	7	0,200-0,140	16	26	0,135-0,120	10	0,100-0,01	35
M. 13	0,300-0,280	5	0,255-0,225	9	—	—	14	0,190-0,100	56	0,100-0,01	36
M fœt. 9	0,300-0,240	16	0,240-0,190	10	0,180-0,140	10	36	0,140-0,110	12	0,100-0,01	22
M fœt. 10	0,300-0,250	20	0,230-0,175	12	—	—	32	0,150-0,100	23	0,095-0,01	23
M fœt. 12	0,300-0,260	10	—	—	0,185-0,140	12	22	0,140-0,100	10	0,100-0,01	27

préparation à l'autre. Nous intitulerons ces zones Ia, Ib, Ic, II, III. Les zones II et III peuvent quelquefois elles-mêmes être décomposées en deux sous-zones que nous avons négligées. Nous reportons dans le tableau X, les limites des différentes zones observées dans plusieurs préparations de métamyosine, exprimées en molarité d'acétate de sodium et leurs importances quantitatives en μg d'azote protéique précipité. Les limites des zones de précipitation varient dans une certaine mesure suivant les préparations : c'est ainsi qu'en particulier le début de précipitation du constituant II apparaît pour une concentration saline d'autant plus grande qu'il est plus abondant dans la solution. Par contre, la limite supérieure du constituant III est remarquablement constante.

En reportant, en fonction de la concentration saline, la solubilité de chacun des cinq constituants considérés séparément les uns des autres dans toutes les préparations analysées, nous trouvons cinq fragments d'exponentielles caractérisées par leurs positions par rapport aux concentrations salines. Dans une expérience, après avoir tracé la courbe de solubilité pour la concentration en protéine initiale habituelle (100 μg d'azote protéique /ml), nous avons déterminé la même courbe pour une concentration protéique double et nous avons constaté que les limites des zones de précipitation restaient les mêmes tandis que la solubilité de chacun des constituants doublait pour une même concentration saline.

Nous reportons le tracé d'une de ces courbes (fig. 16) et les cinq expo-

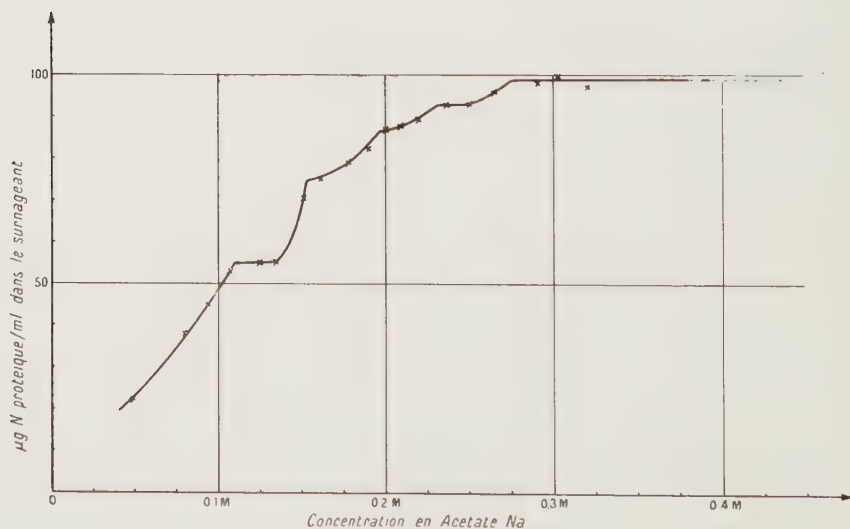


FIG. 16. — Courbe de solubilité d'une préparation de métamyosine (Lapin adulte n° 560)

nentielles caractérisant chacun des constituants chez l'adulte et le fœtus (fig. 17).

Notons quelques différences entre les courbes d'origine adulte (lapins et moutons) et les courbes d'origine fœtale: la zone Ia est toujours plus

importante chez le fœtus (16, 20, 10 μg au lieu de 0, 4, 5, 0, 0, 3 et 5 μg). L'exponentielle III est différente, traduisant une plus faible solubilité chez le fœtus.

En résumé, les résultats obtenus traduisent la multiplicité des formes moléculaires présentes dans les solutions de métamyosine. Notons la variabilité des proportions relatives des différents constituants, de leur

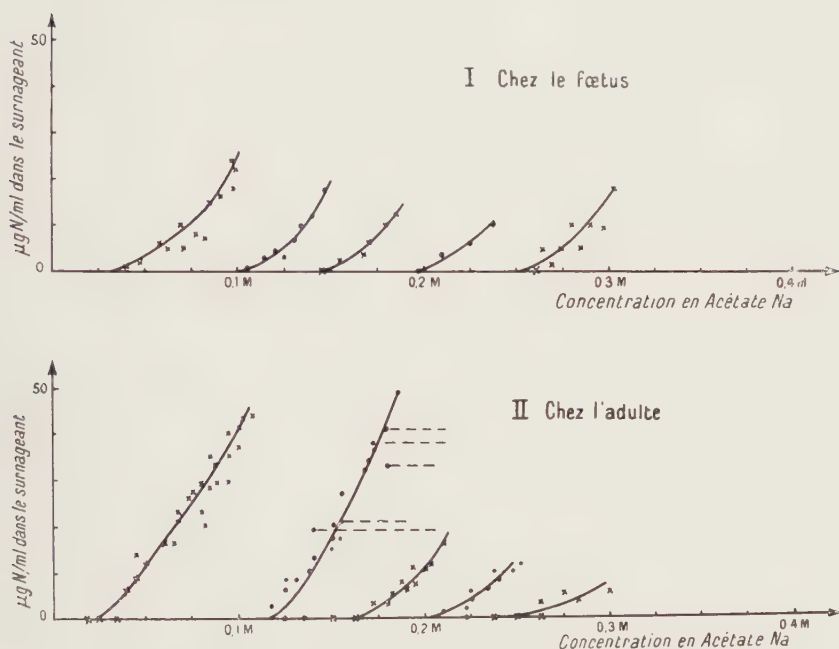


FIG. 17. — Courbes de solubilité des cinq constituants des préparations de métamyosine

nombre, et même dans une certaine mesure des limites de leurs zones de précipitation d'une préparation à l'autre.

Enfin, la solubilité de chacun d'eux varie beaucoup avec la concentration initiale en protéines.

II. — ÉTUDE CHIMIQUE.

A. — ACIDES NUCLÉIQUES

Le spectre ultra-violet des préparations de métamyosine d'origine adulte ou fœtale présente un maximum se situant, suivant les cas, à 260 $m\mu$, 275 $m\mu$, ou entre les deux. De plus, nous avons noté quelquefois la présence d'un pic, à l'électrophorèse, de mobilité $-10 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$, au pH 7,1. Ces deux faits montrent la présence d'acides nucléiques.

Nous avons dosé la quantité d'acides nucléiques présente dans nos préparations par la technique d'Ogur et Rosen (45) (Tableau M).

TABLEAU XI. — *Teneur en acides nucléiques des préparations de métamyosine*

N° DE L'ANIMAL	µg PHOS- PHORE ARN (par mg de protéines)	µg PHOS- PHORE ADN (par mg de protéines)	g ARN (p. 100 g de protéines)	g ADN (p. 100 g de protéines)	g ACIDES NUCLÉIQUES (p. 100 g de protéines)
M. 13 adulte	1,7	3,4	2	4	6
M. 11 adulte	1,6	1,8	1,9	2,1	4
L. 571 adulte	1,6	0,4	1,9	0,5	2,4
L. 572 adulte	1,4	2,0	1,7	2,4	4
M. 12 fœtus	12	0,8	14,4	1	15,4
	16	1,2	19	1,4	20,4
M. 14 fœtus	14	13	17	15,5	32,5

Les quantités d'acides nucléiques trouvées chez l'adulte sont comparables à celles trouvées par Hamoir (24) dans les préparations de tropomyosine tandis que les quantités trouvées chez le fœtus sont comparables à celles que le même auteur trouve dans les préparations de nucléotropomyosine.

Cette abondance des acides nucléiques dans les préparations fœtales reflète soit une association entre ces substances et la protéine, soit, plus simplement, leur grande concentration dans la cellule musculaire, ce qui ne nous étonne pas de la part d'un tissu fœtal où se fait une intense synthèse protéique.

Or, à l'électrophorèse, les acides nucléiques, ou, au moins, une certaine partie d'entre eux, migrent indépendamment de la métamyosine. Nous avons réussi à en séparer, par fractionnement électrophorétique, 70 p. cent dans une expérience.

La teneur en acides nucléiques diminue si l'on prépare la métamyosine fœtale à partir des myofibrilles. Nous avons eu, d'autre part, l'occasion de doser les acides nucléiques contenus dans des préparations de myosine et nous avons obtenu des chiffres tout à fait comparables pour le lapin adulte et le fœtus.

Ces faits nous incitent à penser que les acides nucléiques n'ont pas de liaison particulière avec la métamyosine, et qu'il ne s'agit pas par conséquent, d'une association telle que celle que présente l'actine avec l'ADP, ou la tropomyosine avec les acides nucléiques dans la nucléotropomyosine.

B. — RECHERCHE DE GLUCIDES

En raison de la grande viscosité des préparations de métamyosine fœtale, on pouvait se demander s'il n'existait pas de liaison avec des polysides. La recherche des glucides par la technique à l'anthrone a permis de constater que leur proportion n'excède pas 2 g p. 100 g de protéines.

III. — ÉTUDE ENZYMATIQUE.

A. — ACTIVITÉ A.T.PASIQUE

Les conditions de mesure de l'activité ATPasique ont été décrites dans le chapitre II. Nous avons comparé les quantités de phosphore libéré par la métamyosine et l'actomyosine ou la myosine dans les mêmes conditions.

Contrairement à la myosine, la métamyosine n'a pas d'activité ATPasique.

TABLEAU XII. — *Activité A.T.Pasique de la métamyosine*

PRÉPARATION	QUANTITÉ DE PROTÉINE MISE EN RÉACTION	ACTIVITÉ ATPASIQUE (μ g de P libéré, 5 min. à 37°)
Métamyosine		
L. 571 adulte	318 μ g	0
L. 548 adulte	103 μ g	0
M. 4 fœtus	100 μ g	0
Myosine		
L. 550	100 μ g	19,5 μ g
Actomyosine		
L. 547	106 μ g	31,5 μ g
L. 548	105 μ g	11 μ g

B. — ACTIVITÉ ACIDE ADÉNYLIQUE DÉSAMINASIQUE

Les préparations de métamyosine faites à partir de muscles de lapins adultes ont toujours une certaine activité acide adénylique désaminasique. Par contre, les activités sont beaucoup plus faibles pour les préparations obtenues à partir de muscles de fœtus de lapins et de muscles de moutons, adultes et fœtaux.

Voici les activités observées dans nos préparations (tableau XIII), exprimées selon Kalckar (29) en diminution de densité optique ($\times 1.000$) à 265 m μ pendant 5 minutes, par μ g d'enzyme à 27° C. et au pH 5,9 (tampon succinique 0,1 M, NaCl 0,2 M). La diminution de densité optique est due à la transformation de l'acide adénylique (concentration 4,5 10^{-5} M) en acide inosinique moins absorbant.

Nous portons également dans le même tableau XIII les activités mesurées pour la fraction I des préparations de métamyosine de lapins adultes, obtenues par précipitation fractionnée dans des solutions d'acétate de sodium.

Les activités trouvées dans les préparations de métamyosine de lapin adulte et plus particulièrement dans la fraction I de ces préparations ne

sont pas négligeables si on les compare à celles qui ont été publiées pour la myosine et la désaminase musculaire jusqu'à une date récente.

Rappelons tout d'abord qu'une chute de densité optique à 265 m μ de 105 (10^{-3}) en 5 minutes par μ g d'enzyme équivaut à la transformation de 1 μ g d'acide adénylique par minute et par μ g d'enzyme en acide inosinique avec dégagement d'une molécule d'ammoniaque par molécule d'acide adénylique désaminée.

Nous ne comparerons que les activités mesurées selon la technique de Kalckar, dans des conditions expérimentales identiques.

TABLEAU XIII. — *Activité acide adénylique désaminasique des préparations de métamyosine*

PRÉPARATION	ACTIVITÉ DÉSAMINASIQUE $\Delta E \times 1000$ 5 min mg enzyme
Lapin adulte N° 549.....	68
555.....	192
556.....	44
565.....	62
566.....	95
568.....	59
Fr. I de ces préparat. N° 566..	266
564..	800
563..	115
561..	138
568..	130
Mouton adulte N° E3.....	3
H.....	18
G.....	7
Fœtus de lapin N° 551.....	2
Fœtus de mouton N° 12.....	1,5
9.....	0,8
10.....	4
1.....	1

Kalckar indique pour la désaminase qu'il purifie à partir de solutions de myosine une activité de 105.

Engelhardt (15), qui ne précise pas sa méthode de préparation de myosine, indique qu'après l'avoir chauffée 5 minutes à 53° C., et éliminé 90 p. cent des protéines qui coagulent à cette température, il concentre de 5 à 10 fois l'activité enzymatique dans le surnageant, qui, dans les cas les plus favorables, a une « activité molaire » de 2.000 molécules de substrat pour 10^5 g de protéines par minute et par μ g d'enzyme, soit 735.

Locker (34) a repris ce travail en précisant les conditions expérimentales de la dénaturation partielle par la chaleur. Il exprime ses résultats en Q NH₃, soit en μ l de NH₃ dégagé par mg de protéine et par heure. Pour la préparation de myosine initiale, il trouve un Q NH₃ moyen de 50, ce qui correspond à la transformation de 0,043 μ g d'acide adénylique par minute et par μ g d'enzyme, soit à une diminution de densité optique à

265 m μ de 1,4 par 5 minutes et par μ g d'enzyme. Après chauffage, le surnageant a un Q NH₃ de 100, soit une activité de 3,8 dans nos unités. Il concentre encore cette activité en recueillant la fraction P des protéines du surnageant qui précipitent à faible force ionique (0,05 μ) jusqu'à la valeur du Q NH₃ de 130, soit 3,6 dans nos unités.

Qualitativement, les résultats de ces deux auteurs sont les mêmes, mais ils diffèrent beaucoup quantitativement. Engelhardt d'une part opère sur une solution de myosine beaucoup plus active que celle de Locker (100 environ au lieu de 1,4), et d'autre part il concentre davantage l'activité par action de la chaleur : 5 à 10 fois, alors qu'elle double seulement dans les expériences de Locker. Engelhardt semble obtenir une séparation presque totale des molécules responsables de l'activité enzymatique, car l'activité de 735 qu'il a obtenue est de très peu inférieure à l'activité décrite récemment pour l'enzyme cristallisé (760). Malheureusement, les conditions expérimentales ne sont pas précisées.

Les interprétations données par les deux auteurs sont également différentes : pour Engelhardt la chaleur sépare deux sortes de protéines par leurs stabilités différentes à 53° C.; pour Locker la chaleur libère plusieurs sous-unités de la molécule de myosine, dont l'une, la fraction P, précipitant à faible force ionique, ressemble beaucoup à la myosine elle-même par ses propriétés mais en diffère par une activité enzymatique accrue et une plus grande stabilité à la chaleur.

Nous avons également reproduit la même expérience dans les conditions de Locker avec de la myosine préparée selon Weber, ayant une activité de 4. Par l'action de la chaleur nous concentrons environ trois fois l'activité qui atteint 14 dans le surnageant. La fraction P de ce surnageant a alors une activité de 27. Analysée par viscosimétrie et électrophorèse, elle présente les mêmes caractères que la myosine. De plus, si nous la portons à son tour 5 minutes à 53° C., nous obtenons la coagulation de 65 p. 100 des protéines avec une concentration proportionnelle de l'activité désaminasique qui passe de 27 à 50. Ceci est incompréhensible dans l'hypothèse de Locker d'une sous-unité stable. Les résultats de Locker et les nôtres s'interprètent plus facilement si nous supposons que toute la désaminase contenue dans les préparations initiales reste en solution à 53° tandis que la myosine coagule partiellement. Nous retrouvons dans la fraction P, ensuite, la myosine non dénaturée avec la désaminase : une activité de 27 correspondant à 3,5 p. cent d'enzyme dans le mélange, si on admet que l'activité de l'enzyme pur est 760, cette fraction possède tout naturellement les propriétés de la myosine elle-même.

D'autre part, nous devons considérer les activités désaminasiques des préparations de désaminase musculaire, différentes des préparations de myosine : Nikiforuk et Colowick (44), perfectionnant et combinant les préparations de Schmidt et de Kalckar, obtiennent une activité de 10.000 unités par mg (l'unité d'activité correspondant à un Δ E 265 m μ de 0,01 par minute et par mg), soit 50. Cette activité est deux fois et demie plus grande au pH 6,4, dans un tampon citrate, donc de 125. Le turn-over est alors de 2.200 moles pour 10⁵ g de protéines par minute.

Enfin, tout récemment, Ya-Pin-Lee (76) a réussi à cristalliser une désaminase musculaire, pure enzymatiquement, homogène à tous les critères de pureté. La préparation commence par une extraction à force ionique

élevée, puis une précipitation par dilution de l'extrait : dans ces conditions, on isole les protéines du groupe des myosines. Ensuite, on chauffe la solution 2 minutes à 50° selon un procédé dérivé directement de l'observation d'Engelhardt et c'est sur le surnageant non dénaturé que les purifications ultérieures se poursuivent. L'auteur obtient un turn-over de 187.000 moles pour 10⁵ g de protéines par minute dans les conditions optima. Dans les conditions du dosage de Kalckar, l'activité est de 152.000 unités par mg, soit 760 en ΔE 265 m μ pour 5 minutes et par μ g d'enzyme. Le pH optimum pour l'activité est 5,9 dans les premiers stades de la purification, mais passe au pH 6,4 pour l'enzyme cristallisé.

Nous résumons ces données dans un tableau comparatif (Tableau XIV).

TABLEAU XIV. — *Tableau comparatif
des activités acide adénylique désaminasiques
obtenues par différents auteurs*

AUTEURS	MATÉRIEL ANALYSÉ	ACTIVITÉ DÉSAMINASIQUE $\times 1000$ en ΔE 265 m μ / 5 min./ μ g enz.
KALCKAR	Désaminase purifiée à partir d'une solution de myosine.	105
ENGELHARDT	Surnageant non dénaturé par la chaleur d'une solution de myosine.	735
LOCKER	—	4,7
NIKIFORUK-COLOWICK	Désaminase musculaire.	125
YA-PIN-LEE	—	760
Nous-mêmes	Myosine selon Weber.	4
	Fraction P après chauffage de la myosine Weber.	50
	Métamyosine.	40 à 190
	F 1 de Métamyosine.	100 à 300
	Fraction P après chauffage de la métamyosine.	(une fois 800 400)

Ainsi le problème posé par la présence d'une activité acide adénylique désaminasique dans les préparations de myosine, se pose à nouveau pour la métamyosine : l'activité est-elle due à la métamyosine elle-même ? L'enzyme est-il au contraire une protéine étrangère, se trouvant en impureté au sein des préparations de métamyosine ? Cet enzyme a-t-il une relation chimique ou physiologique avec la métamyosine ?

Les faits expérimentaux s'interprètent plus facilement dans l'hypothèse d'un enzyme indépendant de la métamyosine. En effet :

1° L'activité des préparations de métamyosine de lapin adulte n'est pas constante, ni celle des fractions I de ces préparations. De plus, l'activité des mêmes préparations chez le mouton adulte est très différente, bien que les autres propriétés soient les mêmes.

2° Si l'on chauffe une solution de métamyosine quelques minutes à 50°, environ 50 p. cent des protéines coagulent et l'activité enzymatique double dans le surnageant. La fraction P de ce surnageant qui précipite à faible force ionique est difficile à redissoudre. Son activité est encore supérieure à celle du surnageant. Nous reportons nos résultats à ce sujet dans le tableau XV, comparés à ceux que nous avons obtenus dans les mêmes conditions pour la myosine et l'actomyosine :

TABLEAU XV. — *Activité désaminasique au cours de la coagulation partielle des préparations de métamyosine*

PROTÉINE ÉTUDIÉE	ACTIVITÉ AVANT CHAUFFAGE ΔE 1000/ 5 min./ μg	P. 100 DES PROTÉINES COAGULÉES À 50°	ACTIVITÉ DU SURNAGEANT APRÈS CHAUFFAGE	ACTIVITÉ DE LA FRACTION P
Métamyosine L. 568.	59	50	100	400
Métamyosine L. 575.	60	55	110	220
Myosine L. 567	3,7	84	14	27
Actomyosine L. 568..	6,5	82	24	45

Si nous retenons l'hypothèse de l'identité de la métamyosine et de la désaminase, il faudra supposer que la métamyosine possède, comme la myosine, d'après Locker, une sous-unité active libérée par la chaleur dans les mêmes conditions. Ici aussi, ces expériences s'interprètent plus simplement en supposant que l'activité désaminasique est due à une protéine étrangère qui reste en solution à 53° tandis que la moitié environ des protéines de métamyosine coagule dans ces conditions. Soulignons les stabilités différentes de la myosine et de la métamyosine à la chaleur.

3° Le fait que plusieurs préparations de protéines musculaires possèdent une activité acide adénylique désaminasique s'interprète plus facilement par la présence d'une même impureté que par une propriété commune. Nous avons trouvé une certaine activité dans les solutions de myosine, d'actomyosine, de métamyosine et de contractine. Corsi (7) en trouve également dans l'Extra-Protéine d'Andrew Szent-Gyorgyi-Villafra.

En ce qui concerne la myosine, la contractine et la métamyosine, on peut remarquer que l'activité contenue dans leur solution est en raison inverse de leur abondance dans le muscle. Etant donné que leurs techniques de préparation comportent des opérations très voisines : extraction par une solution de force ionique 0,6 puis séparation de l'actomyosine à la force ionique 0,3, on peut supposer en effet qu'une même quantité de désaminase contamine des quantités de protéines plus ou moins grandes suivant l'abondance même de la protéine considérée dans le muscle.

4° La désaminase isolée par Ya-Pin-Lee possède des mobilités électrophorétiques identiques à celles de la métamyosine pour des pH compris entre 5,0 et 7,5. Mais au-dessus de pH 7,5 les deux courbes se sépa-

rent, la désaminase ayant alors une mobilité plus grande. Au pH 8,25 la mobilité de la désaminase est de $-3,35 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec., très différente de celle de la métamyosine égale à $-2,1 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec. Nous avons pu observer dans des préparations de métamyosine enrichies en désaminase (F 1 et F 2 après chauffage) les deux pics correspondant à la métamyosine et à l'enzyme : les deux expériences ont été faites dans un tampon NaCl, phosphate disodique de force ionique 0,2, tel qu'il est décrit par Ya-Pin-Lee.

Y a-t-il association chimique ou physiologique entre les deux protéines ?

En faveur d'une association chimique des deux protéines, on peut faire remarquer que la désaminase précipite préférentiellement avec la fraction I des préparations de métamyosine de lapin adulte entre 0,3 M et 0,2 M acétate de sodium, alors que, d'après les résultats publiés par Ya-Pin-Lee, la désaminase purifiée est encore soluble à 0,2 μ et même 0,1 μ puisque des électrophorèses ont pu être faites dans ces conditions.

Il est encore plus délicat de savoir si la présence de la désaminase dans les préparations de métamyosine de lapin adulte correspond à une relation physiologique dans la cellule musculaire entre les deux protéines : d'après Engelhardt (15), il est permis de penser qu'on extrait du muscle des « complexes enzymatiques définis, que l'on peut artificiellement démembrer, mais que l'on a toutes les raisons de considérer non pas comme un mélange accidentel, mais comme une unité physiologique déterminée ». Cette hypothèse, formulée à propos de l'ensemble myosine-désaminase, peut l'être également à propos de l'ensemble myosine-métamyosine-désaminase, qui semblent bien être les membres d'une même « famille physiologique », si de telles familles existent.

IV. — ÉTUDE TOPOGRAPHIQUE.

Origine myofibrillaire de la métamyosine.

Nous avons démontré l'origine myofibrillaire de la métamyosine en la préparant à partir de myofibrilles isolées soigneusement selon la technique de S.V. Perry (46) de muscles adultes et fœtaux.

A partir de ce matériel, on peut préparer de la métamyosine : les lavages préliminaires sont devenus inutiles et il suffit d'extraire une demi-heure par la solution habituelle, après un broyage de quelques minutes au Waring-Blendor, et de purifier l'extrait de la façon habituelle.

V. — FRACTIONNEMENT DES PRÉPARATIONS DE MÉTAMYOSINE ET ÉTUDE DES FRACTIONS.

Ayant constaté l'hétérogénéité de nos préparations de métamyosine par viscosimétrie, électrophorèse et par l'étude de la courbe de précipitation par dilution dans l'acétate de sodium, nous avons cherché à isoler des fractions plus homogènes pour en étudier les propriétés.

Nous avons procédé en diluant progressivement avec de l'eau nos solu-

tions et en recueillant le précipité formé à chaque étape, par centrifugation, après avoir laissé une nuit l'équilibre s'établir à la température de la glace fondante. Nous nous sommes reporté aux courbes de solubilité pour déterminer entre quelles limites de concentration saline on devait recueillir les différentes fractions.

Cette étude n'a pu porter que sur les préparations de métamyosine extraite de muscles de lapins et de moutons adultes et de fœtus de moutons, les quantités de muscles de fœtus de lapins disponibles étant beaucoup trop faibles.

RÉSULTATS OBTENUS

Les préparations ont été fractionnées en trois:

F _I	de 0,3 M à 0,16 M
F _{II}	de 0,16 M à 0,1 M
F _{III}	de 0,1 M à 0,01 M

La fraction I a été quelquefois subdivisée elle-même en trois dans les préparations de métamyosine fœtale.

1^o La métamyosine de mobilité $1,85 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec., pH 7,1, précipite pour des concentrations salines plus élevées que la métamyosine de mobilité 1,2, chez l'animal adulte comme chez le fœtus. Mais la séparation ne peut être totale que pour le constituant le plus abondant des différentes préparations : c'est ainsi qu'on obtient le constituant le plus rapide, seul, dans la fraction I chez l'adulte, tandis que le constituant lent peut être isolé chez le fœtus dans les fractions II et III.

Le tableau XVI rassemble les mobilités, mesurées au pH 7,1, pour les différents constituants observés dans les différentes fractions.

TABLEAU XVI. — Mobilités des gradients électrophorétiques observés dans les différentes fractions isolées à partir des préparations de métamyosine

ANIMAL ÉTUDIÉ	MOBILITÉS 10^{-5} CM ² V ⁻¹ SEC. ⁻¹									
	F I				F II				F III	
Lapins adultes			-1,82				-1,93			
			-1,7				-1,8		-1,0	-1,7
			-1,87		-0,35	-1,4	-1,9		-1,3	-1,8
			-1,7	-2,0	-0,7	-1,2	-1,8		-1,1	-1,6
							-1,82			
Moutons adultes									-0,7	-1,3
			-1,9				-1,9			-2,2
Fœtus de mouton		-1,1	-1,85							
F Ia et F Ib		-1,35		-2,2		-1,3			-1,3	
				-2,0						
F Ic	-0,3	-1,0	-1,7		-0,95				-1,0	
		-1,05								

Remarquons qu'à côté des deux constituants les plus fréquemment rencontrés, nous en avons distingué deux autres dont nous donnons les mobilités. Nous avons déjà rencontré des mobilités supérieures à — 2,0 dans les préparations globales, comme on peut le voir dans le tableau de mobilités donné au début de ce chapitre.

2° Les différentes fractions isolées possèdent des propriétés de viscosité différentes : chez l'adulte et chez le fœtus, la viscosité relative augmente quand on passe des fractions I à II et III. De plus, chaque fraction possède une viscosité bien déterminée : chez l'adulte, sur 10 expériences nous avons eu deux fractions I, deux fractions II et deux fractions III de viscosités aberrantes (fig. 18). Chez le fœtus, l'accord est bon entre les quatre expériences que nous avons faites (fig. 19).

Chez l'adulte, dans une expérience, nous avons subdivisé la fraction I en trois sous-fractions Ia, Ib, Ic, et obtenu des viscosités identiques pour les trois. Au contraire, chez le fœtus, il convient de distinguer la viscosité des sous-fractions Ia et Ib de celle de Ic.

La présence de ces fractions de viscosités différentes au sein des préparations de métamyosine explique la variabilité des viscosités des préparations globales que nous avons constatée chez l'adulte.

Nous reportons dans le tableau XVII les valeurs des viscosités spécifiques par g/ml extrapolées pour une concentration nulle, des différentes fractions.

TABLEAU XVII. — *Viscosités spécifiques par g/ml extrapolées pour une concentration nulle des différentes fractions isolées des préparations de métamyosine*

ANIMAL ÉTUDIÉ	$\left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)_{C \rightarrow 0}$				
	PRÉPARATIONS GLOBALES	F I		F II	F III
		F Ia et F Ib	F Ic		
Lapins et moutons adultes	80	60		120	180
Fœtus de mouton ..	260	170	250	600	600

Les fractions fœtales sont toujours plus visqueuses que les fractions adultes correspondantes.

Les différences de viscosité observées entre les fractions ne peuvent être dues à la répartition inégale des acides nucléiques entre elles. Remarquons que les fractions III fœtales et adultes présentent des droites $\left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right) f(c)$ dont les pentes sont plus élevées que celles des fractions I et II (fig. 20).

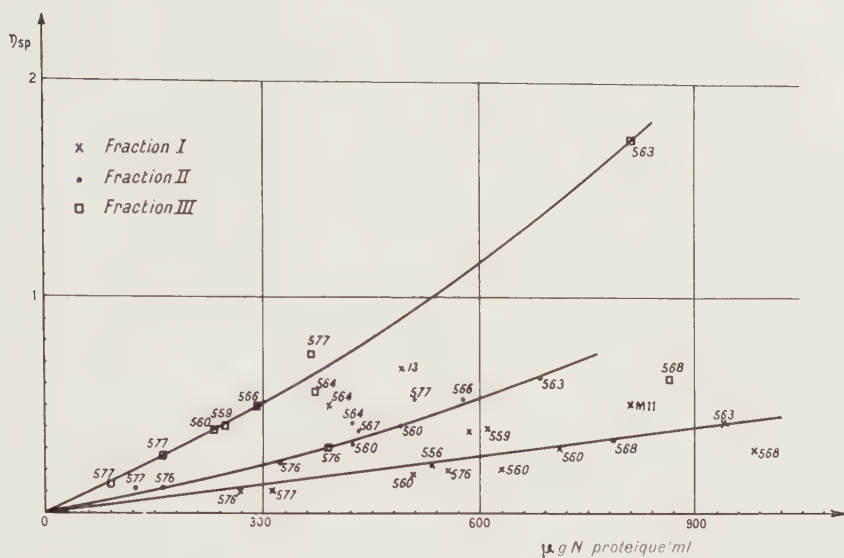


FIG. 18. — Viscosités spécifiques des fractions adultes.

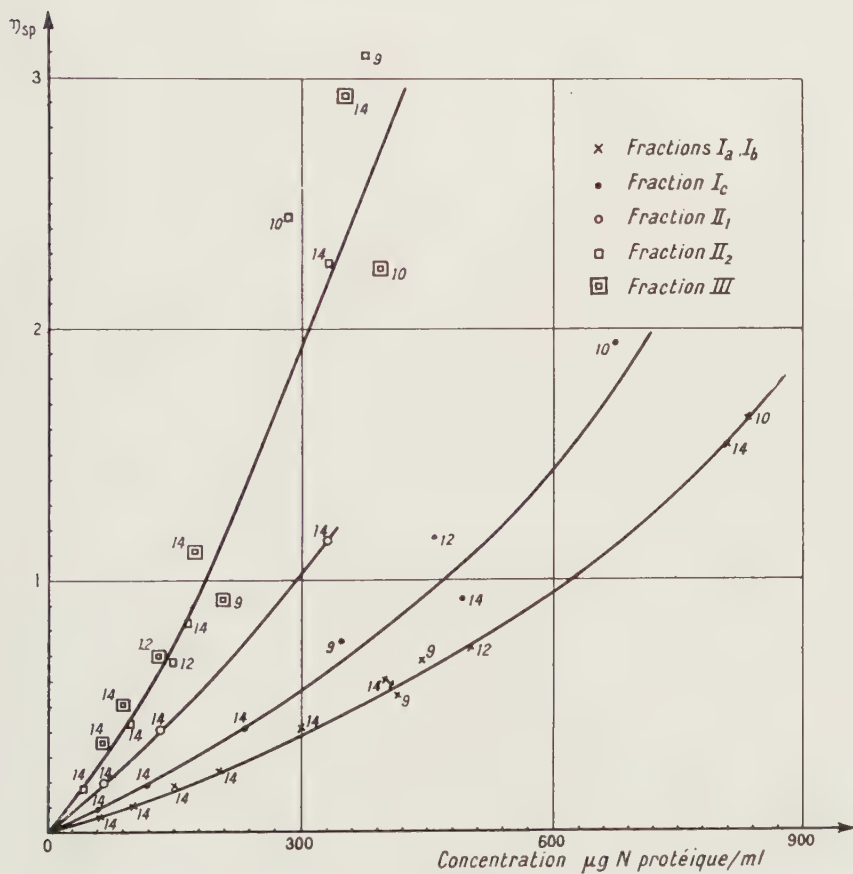


FIG. 19. — Viscosités spécifiques des fractions fœtales.

3° La répartition de l'activité acide adénylique désaminasique varie beaucoup suivant l'animal étudié :

TABLEAU XVIII. — *Activités acide adénylique désaminasiques des différentes fractions isolées des préparations de métamyosine*

ANIMAL ETUDIÉ	ACTIVITÉ ACIDE ADÉNYLIQUE DÉSAMINASIQUE AE 265 mμ/5 min./μg		
	F I	F II	F III
Lapins adultes ..	800	166	40
	266	65	25
	115	42	50
	138		
	130		
Moutons adultes .	3	3	3
	10	14	60
Fœtus de mouton	1,3	5	1,5
	1,8	3,5	1,3
	2,4		

Nous avons tiré argument de ce fait pour nier l'identité de l'enzyme et de l'un des constituants de la métamyosine.

VI. — DISCUSSION.

L'étude de quelques propriétés de nos préparations de métamyosine nous conduit à les considérer comme des mélanges complexes, soit de plusieurs protéines distinctes, soit de plusieurs formes physiques d'une même protéine.

Les analyses électrophorétiques de nos préparations nous permettent de distinguer deux constituants principaux, chez l'adulte comme chez le fœtus, de mobilité $-1,85 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$, et de $-1,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$, au pH 7,1. Nous avons rencontré, de plus, des constituants de mobilité 0,7 et $-2,1$ au même pH que nous négligerons dans la discussion.

Nous savons, par la viscosimétrie, qu'il existe au sein de nos préparations, des molécules de formes et de tailles différentes, et par l'étude des courbes de précipitation, de solubilités différentes également.

Envisageons les différentes hypothèses que l'on peut faire pour coordonner les résultats expérimentaux :

1° Il y a une seule protéine qui se présente sous différents états moléculaires : on passerait du type métamyosine rapide, peu visqueuse, tel que nous l'avons isolé dans les fractions I adultes, au type de métamyosine lente très visqueuse, tel qu'il se trouve dans les fractions II et III fœtales, par une agrégation moléculaire s'accompagnant d'une variation

de la charge électrique. L'actine nous offre un exemple d'une telle réaction. Cette hypothèse implique que l'état physique, c'est-à-dire la taille et la forme moléculaires, des deux types de métamyosine, soit le même chez le fœtus et l'adulte.

2° Il y a deux protéines, caractérisées par leurs mobilités électrophorétiques, qui ne sont pas interconvertibles et qui existent chacune dans un état moléculaire immuable chez l'adulte et le fœtus.

Dans ces deux hypothèses, on doit expliquer les différences de viscosité des fractions correspondantes adultes et fœtales.

a) soit par la présence d'impuretés visqueuses plus abondantes chez le fœtus, telles que les acides nucléiques. Mais, en ce qui concerne les acides nucléiques, nous avons vérifié que leur présence en quantités plus importantes dans les préparations fœtales n'était pas responsable des différences de viscosité;

b) soit par le fait que nos séparations sont incomplètes en ce qui concerne la métamyosine rapide chez le fœtus et la métamyosine lente chez l'adulte et que nous n'avons mesuré que la viscosité de mélanges. La fraction I fœtale et la fraction III adulte qui ont des viscosités voisines, seraient des mélanges équivalents des deux types de molécules. Cet argument est valable. Mais nous n'avons pu observer, dans bien des cas, un parallélisme entre la viscosité des solutions et les proportions relatives des deux constituants qui les composent : c'est ainsi qu'une de nos fractions II adultes, de viscosité exceptionnellement faible, était principalement composée de métamyosine lente d'après l'analyse électrophorétique.

3° La métamyosine lente et la métamyosine rapide existent dans des états d'aggrégation moléculaire différents chez l'adulte et chez le fœtus, tout en portant la même charge électrique. Chacune d'elle pourrait également exister sous différentes formes dans une même préparation : cette hypothèse permet d'expliquer que des fractions, de même composition à l'électrophorèse, puissent avoir des viscosités différentes; par exemple, des fractions I et II adultes, constituées uniquement de métamyosine rapide, ou encore des fractions II et III fœtales constituées seulement de métamyosine lente.

4° Les protéines étudiées chez l'adulte et le fœtus sont des individus chimiques différents sans aucun rapport : ceci nous paraît difficile à admettre pour des protéines préparées de la même façon, ayant des mobilités électrophorétiques et des propriétés de solubilité identiques.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il peut paraître arbitraire de choisir entre ces éventualités. Cependant, la troisième hypothèse est celle qui s'accorde le mieux avec nos résultats d'expérience : sans rejeter complètement l'idée de la présence d'impuretés visqueuses dans les préparations fœtales, et sans oublier que nos séparations n'ont été qu'incomplètes dans la plupart des cas, nous pouvons admettre schématiquement que nos préparations contiennent au moins deux protéines caractérisées par leurs mobilités électrophorétiques, pouvant exister dans plusieurs états d'aggrégations moléculaires, l'état d'aggrégation étant toujours plus grand chez le fœtus.

CHAPITRE VI

COMPARAISON DE LA MÉTAMYOSINE AVEC LES AUTRES PROTÉINES MYOFIBRILLAIRES

Nous nous proposons dans ce chapitre de comparer la métamyosine aux autres protéines musculaires connues. Il s'agit ici de la métamyosine extraite des muscles de lapins et de moutons adultes, à l'exclusion de sa forme fœtale. D'autre part, nous nous bornerons aux protéines dont l'origine myofibrillaire a été démontrée, ou, au moins, rendue probable par certaines propriétés, en particulier par leurs caractères d'extractibilité. Nous allons les passer en revue, en soulignant ce qui les distingue de la métamyosine :

1. La myosine est différente par son inextractibilité en l'absence d'ATP, par sa mobilité électrophorétique plus grande au pH 7,1, et son point isoélectrique plus élevé, et surtout par ses propriétés fondamentales de se combiner à l'actine et d'hydrolyser l'ATP, que ne possède pas la métamyosine.

2. L'actomyosine se distingue notamment par ses propriétés de solubilité, sa mobilité électrophorétique au pH 7,1 et sa propriété de donner des solutions dont la viscosité diminue sous l'action de l'ATP.

3. L'actine et la tropomyosine ont des propriétés d'extractibilité et de solubilité différentes de celles de la métamyosine et des mobilités électrophorétiques plus élevées au pH 7,1.

4. La D-protéine, l'Extra-Protéine, la Protéine Y, la pseudoglobuline de Perry, la H-méromyosine sont solubles à faible force ionique.

5. Nous avons déjà longuement comparé la désaminase de Ya-Pin-Lee et la métamyosine. Elles se distinguent principalement par leurs différentes stabilités à 50° et par leurs mobilités électrophorétiques au pH 8,25.

6. La L-méromyosine présente quelques analogies avec la métamyosine : propriétés de solubilité, absence d'activité ATPasique et du pouvoir de se combiner à l'actine, présence d'une activité acide adénylique désaminasique dans les solutions. Mais la viscosité intrinsèque de la L-méromyosine est de 100, un peu plus élevée que celle de la métamyosine, voisine de 80. Et surtout, le point isoélectrique de la L-méromyosine, déterminé par Nanninga à l'aide d'une technique d'électrotitration, est au pH 5,7, donc très différent de celui que nous avons trouvé pour la métamyosine à l'électrophorèse. Malgré les différentes conditions expéri-

mentales dans lesquelles ces deux déterminations ont été faites, la comparaison se justifie, puisque, d'après Nanninga, la présence de sels dans le milieu ne change pas le point isoélectrique de la L-méromyosine.

7. Enfin, il nous reste à comparer la contractine à la métamyosine. Nous savions déjà, d'après les travaux publiés par Dubuisson et ses collaborateurs, que la contractine était présente dans les extraits musculaires de lapins faits à force ionique élevée à partir de muscles contracturés et que sa mobilité, plus faible que celle de la myosine, était de $-2,4 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec. au pH 7,1 quand elle était en faibles quantités. Cette mobilité pouvait diminuer jusqu'à la valeur de $-2,0$ quand la contractine se trouvait en plus grandes quantités dans l'extrait.

Ces quelques données étaient insuffisantes pour distinguer cette protéine de la métamyosine. Nous avons dû mettre au point une méthode d'isolement de la contractine pour l'étudier (53 bis).

Isolement de la contractine.

Nous avons tout d'abord constaté, à la suite de Dubuisson, que la contractine n'était pratiquement pas extraite du muscle contracturé par

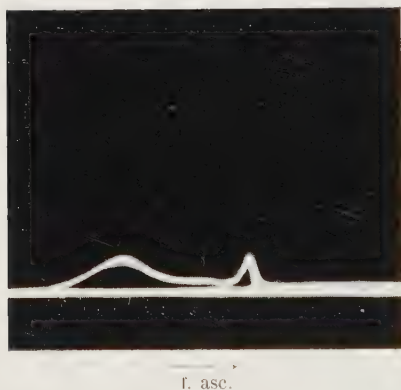


FIG. 21. — Extrait musculaire de muscles contracturés.

Solution d'extraction : KCl 0,3 M,
phosphates K 0,15 M, pH 6,5
Exp. N° 146 - L. 545
pH 7,1 — Après 76.200 secondes
De gauche à droite : myogène -
myosine - actomyosine

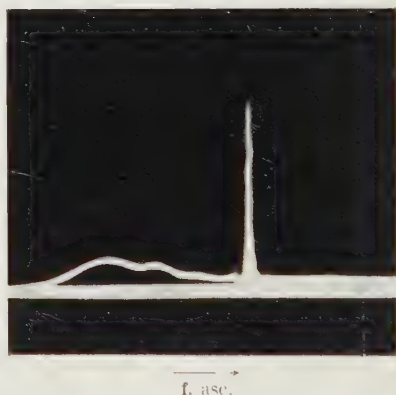


FIG. 22. — Extrait musculaire de muscles contracturés.

Solution d'extraction : KCl 0,6 M,
CO₃HNa 0,03 M, pH 8,0
Exp. N° 147 - L. 545
pH 7,1 — Après 79.500 secondes
De gauche à droite : myogène -
contractine - myosine - actomyosine

la solution KCl 0,3 M, phosphates K 0,15 M, de pH 6,5, que nous utilisons pour l'extraction de la métamyosine. Ce qui constituait une première distinction. De plus, la solution d'extraction KCl 0,6 M, CO₃HNa 0,03 M, de pH 8, qui, d'après Crepax (10) est favorable à l'extraction de la contractine, et que nous utilisons également à cet effet, extrait mal la métamyosine.

On prépare la contractine de la façon suivante : le lapin, anesthésié au chloral, est saigné et sacrifié. Il est dépouillé, éviscéré et conservé 24 heures à la chambre froide. Après ce temps, les muscles, en état de rigor mortis, sont prélevés et broyés au Latapie refroidi. Toutes les opérations sont faites à 5° C. Le broyat musculaire est agité pendant une demi-heure avec 3 volumes de la solution d'extraction KCl 0,6 M, CO₃ HNa 0,03 M, pH 8,0. L'extrait, séparé du résidu musculaire par centrifugation, est dilué par 14 volumes d'eau. Le précipité est redissous dans une solution KCl 0,3 M, phosphates K 0,15 M, de pH 6,5, dilué aux 2/3. On fait une précipitation fractionnée de l'actomyosine à 0,3 μ , comme dans la technique de préparation de myosine de Portzehl, Schramm et Weber. La contractine reste en solution. On la précipite à 0,03 μ et on la redissout dans une solution saline (KCl 0,4 M, tampon phosphates K 0,05 M, pH 6,8). Une deuxième précipitation fractionnée de l'actomyosine est quelquefois nécessaire. Le rendement de cette préparation est de 1 mg de protéine par g de muscle frais.

La contractine obtenue est généralement pure à l'électrophorèse. Toutefois, les impuretés que l'on peut rencontrer sont le plus souvent une protéine de mobilité $-4,5 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec., au pH 7,1, qui pourrait être de la tropomyosine et plus rarement de la métamyosine ou de la myosine (fig. 23).

Propriétés de la contractine comparées à celles de la métamyosine.

a) Mobilité électrophorétique : au pH 7,1, dans les mêmes conditions expérimentales que pour la métamyosine, nous avons obtenu les résultats rassemblés dans le tableau XIX.

TABLEAU XIX. — Mobilité de la contractine au pH 7,1

ANIMAL	N° D'ÉLECTROPHORÈSE	MOBILITÉ 10 ⁻⁵ cm ² /V/sec.
L. 556	175	— 1,97
L. 550	160	— 1,97
L. 548	158	— 1,95
L. 547	155	— 1,97
L. 545	150	— 2,15
L. 23	212	— 1,92
L. 25	243	— 1,85
L. 571	276	— 1,75

En présence d'autres protéines (myosine, métamyosine), la mobilité de la contractine est plus élevée : $-2,1 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec pour le même pH.

La mobilité au pH 7,1 de la contractine est donc en moyenne légèrement plus élevée que celle de la métamyosine. Cette même légère différence se retrouve au pH 5,5 : la contractine a une mobilité de $-0,9 \cdot 10^{-5}$ cm²/V/sec. et la métamyosine de $-0,7$. Mais ces différences sont trop

faibles pour permettre des séparations nettes à l'électrophorèse entre les deux protéines mélangées artificiellement. Mais au pH 5,0, la métamyosine migre vers la cathode avec une mobilité de $+0,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$, tandis que la contractine migre encore vers l'anode avec la mobilité de $-0,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec.}$ Dans ces conditions, il est facile de dissocier les deux protéines mélangées artificiellement au sein d'une même solution et de prouver leur non identité (fig. 24).

b) La solubilité des deux protéines au pH 5,0 dans la solution NaCl 0,35 M, acétate de Na 0,04 M, est très différente : on peut obtenir des

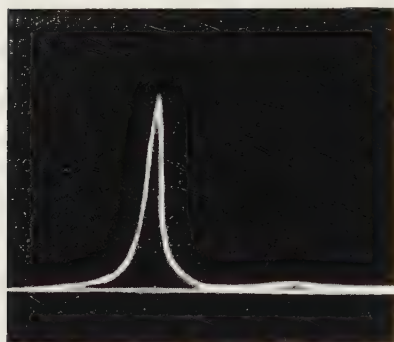


FIG. 23. — Exp. N° 289
(frontière ascendante).

Contractine — Lapin 571, au pH 7,1
après 79.000 secondes

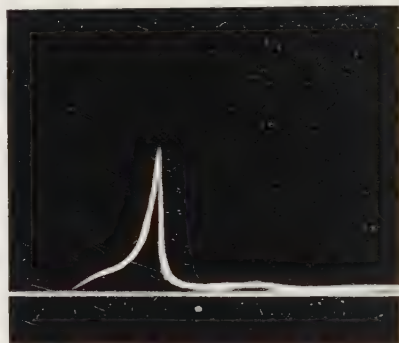


FIG. 24. — Exp. N° 290
(frontière ascendante).
Mélange artificiel de contractine et
de métamyosine au pH 5,0 après
80.000 sec.
(Lapin 574) (Lapin 575)

solutions de contractine à 0,9 g p. 100 dans ces conditions tandis que la métamyosine, beaucoup moins soluble, ne peut être obtenue à plus de 0,3 g p. 100.

c) Les solutions de contractine ont une viscosité intrinsèque bien déterminée, de 100, plus élevée que celle de la métamyosine.

d) Le précipité de contractine possède l'aspect d'un voile caoutchouteux que ne possède pas celui de la métamyosine.

e) Les courbes de solubilité de la contractine dans des solutions d'acétate de sodium ne présentent qu'une seule zone de précipitation, contrairement aux courbes obtenues pour la métamyosine.

f) Les préparations de contractine possèdent une certaine activité acide adénylique désaminasique, inférieure à celles des préparations de métamyosine. Nous avons trouvé en effet 25, 20, 18, 38, 40 $\Delta\text{E } 265 \text{ m}\mu/5 \text{ min}/\mu\text{g.}$ La contractine ne se combine pas à l'actine et n'a pas d'activité ATPasique comme la métamyosine ; le terme de myosine qui lui a été donné est donc impropre.

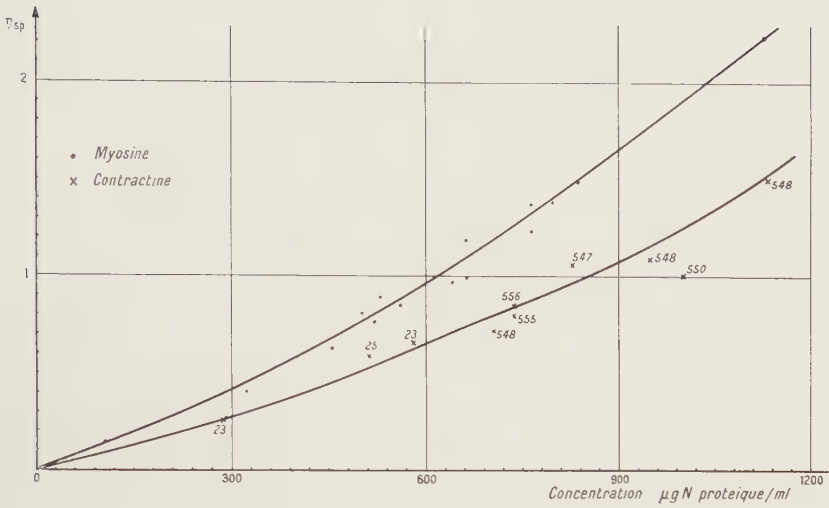


FIG. 25. — Viscosité spécifique de la contractine.

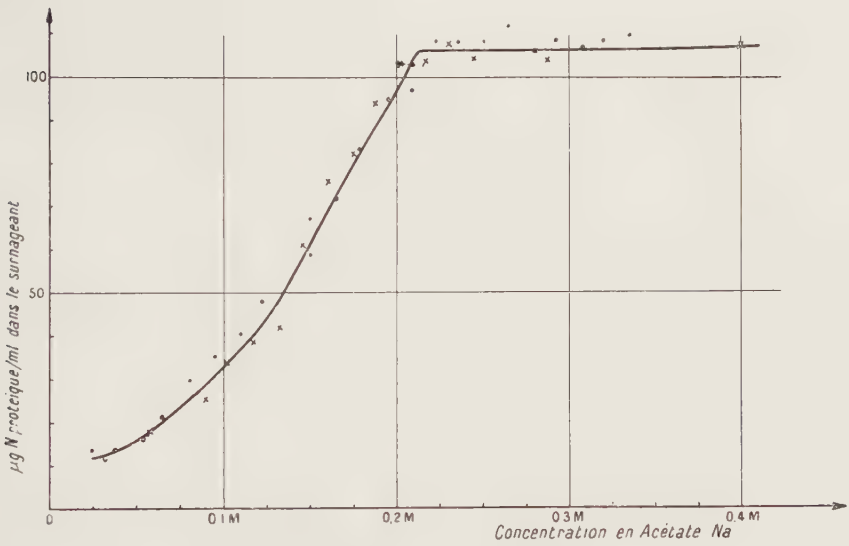


FIG. 26. — Courbe de solubilité de deux préparations de contractine.

En conclusion, nous pouvons affirmer que la métamyosine se distingue par ses propriétés de toutes les autres protéines myofibrillaires connues jusqu'à maintenant.

TABLEAU XX. — Propriétés comparées des protéines myofibrillaires

PROTÉINE	EXTRACTIBILITÉ	SOLUBILITÉ	POINT ISOÉLECTRIQUE	MOBILITÉ A L'ÉLECTRO- PHORÈSE 10 ⁻³ cm ² /V/sec.	au pH	ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	CARACTÈRES PARTICULIERS
MYOSINE	$\mu = 0,6$ en présence d'ATP	Insoluble pour $\mu < 0,1$	5,4	— 2,5 — 3,0	pH 7,1 7,5	ATPase Acide adénylique desaminase Cholinestérase	$[\eta]_1 = 240$ Se combine à l'actine en donnant l'actomyosine.
ACTOMYOSINE	$\mu = 0,6$ en absence d'ATP	Insoluble pour $\mu < 0,3$		— 2,95 — 3,4	7,1 7,5	ATPase	Donne des fils qui se contractent sous l'ac- tion de l'ATP et des solutions dont la vis- cosité diminue sous l'action de l'ATP.
CONTRACTINE	$\mu = 0,6$ du muscle contracturé	Insoluble pour $\mu < 0,2$	pt iso < 5,0	— 2,0	7,1	Acide adénylique desaminase	S'extraît plus abondam- ment du muscle con- tracturé. $[\eta]_1 = 100$
PROTEINE Y	$\mu > 0,5$ du muscle au repos	Soluble à 0,005 μ		— 2,7 — 3,1	7,1		
EXTRA-PROTEIN. (A. SZENT-GYORGYI VILLAFRANCA)	$\mu = 0,6$ avec la myosine	Soluble à faible force ionique					Ne se combine pas à l'actine.
D - PROTEINE	$\mu > 1$	—		— 4,6	7,6		Se combine à la myosine Plus visqueuse que la myosine.
ACTINE	Extraite par l'eau après action de solvants organiques	Soluble dans l'eau et dans les solutions salines	Actine F 4,9 Actine G 5,0-5,1	Actine F — 6,3 Actine G 1,6	7,1 7,1		Existe sous deux for- mes: globulaire et fi- brillaire. Se combine à la myosine.
TROPOMYOSINE	$\mu > 0,6$ ou après action de solvants organiques	Soluble à faible force ionique	5,0	— 4,3	7,1		Existence d'une nucléo- tropomyosine.
DESAMINASE (YA-PIN-LEE)	$\mu = 0,6$ avec la myosine	Insoluble à faible force ionique	5,6 ($\mu = 0,2$) 5,1 ($\mu = 0,33$)	— 2,2 — 3,35	7,6 8,25	Acide adénylique desaminase	Résiste à la chaleur quelques minutes à 50° C.
PSIU DOGLOBULINE (PERRY)	Extraite par borate 0,078 M des myofibrilles	Soluble à faible force ionique		— 3,7	6,5		Serait un mélange d'ac- tine, de tropomyosine, et d'une protéine en- core indéterminée.
L-MEROMYOSINE	Obtenue par digestion trypsine de la myosine	Insoluble pour $\mu < 0,1$	5,7 - 5,8			Acide adénylique desaminase Cholinestérase	Ne se combine pas à l'actine. $[\eta]_1 = 100$
H-MEROMYOSINE	—	Soluble pour toutes les forces ioniques	5,2	— 3,8	7,1	ATPase	Se combine à l'actine. $[\eta]_1 = 32$
METAMYOSINE	$\mu = 0,6$ en présence ou en absence d'ATP	Soluble $\mu > 0,3$	5,1 - 5,2	— 1,85 — 2,1	7,1 8,25	Acide adénylique desaminase	

CONCLUSIONS

I. — ÉTAT DE NOS CONNAISSANCES SUR LA COMPOSITION PROTÉINIQUE MYOFIBRILLAIRE

Si nous connaissons avec certitude quelques protéines d'origine myofibrillaire : myosine, actine, tropomyosine, contractine, d'autres sont, ou bien des substances encore mal définies, ou bien des artéfacts de préparation, intéressants, mais qui ne sont peut-être pas des produits biologiques. Quant à la structure de la myofibrille, on connaît probablement la localisation de l'actine et de la myosine et, par suite, de l'essentiel des bandes A et I. On ignore la localisation des autres protéines (tropomyosine, contractine) et la composition des zones H et Z, ainsi que la nature de l'éventuel substratum de l'élasticité.

Nos connaissances sont encore plus fragmentaires sur la composition de la myofibrille au cours du développement embryonnaire.

Le présent travail a pour but de décrire un nouveau constituant protéinique de la myofibrille musculaire adulte et fœtale.

II. — TECHNIQUES UTILISÉES

Nous avons utilisé :

— *des techniques physico-chimiques :*

électrophorèse en veine liquide avec, soit un système optique classique de Philpot-Svenson, soit un système interférentiel plus sensible permettant l'analyse de solutions protéiniques moins concentrées,

viscosimétrie,

analyse des courbes de précipitation par dilution aqueuse des solutions de protéines par une technique que nous avons mise au point,

— *des techniques chimiques :*

préparations de protéines musculaires, dosages d'acides nucléiques, d'azote, de phosphore,

— *des techniques enzymatiques :*

dosages de l'activité ATPasique et acide adénylique désaminasique.

III. — OBSERVATION DE LA MÉTAMYOSINE CHEZ LE FŒTUS ET ÉVOLUTION AU COURS DE LA VIE FŒTALE

Nous observons dans les préparations de myosine d'origine fœtale, chez le lapin et le mouton, la présence d'une autre protéine, de mobilité différente à l'électrophorèse, que nous avons appelée *métamyosine*. Cette

protéine se trouve masquée par le myogène dans les analyses électrophorétiques d'extraits musculaires totaux. Les proportions de métamyosine extraite avec la myosine, évoluent au cours de la vie fœtale : chez le fœtus de mouton, la métamyosine, qui représente jusqu'à 37 p. 100 des protéines contenues dans les préparations de « myosine » vers la moitié de la vie fœtale (80^e jour), n'en représente plus que 8 p. 100 à la naissance.

L'abondance de la métamyosine dans le tissu musculaire fœtal pose le problème de son rôle éventuel de précurseur pour d'autres protéines musculaires.

IV. — OBSERVATION DE LA MÉTAMYOSINE CHEZ L'ADULTE

Dans les préparations de myosine d'origine adulte, nous observons également à l'électrophorèse 1 à 8 p. 100 d'une protéine dans la même zone de mobilité. Ces observations rejoignent celles de Mommaerts et de Weber qui ont signalé dans leurs préparations la présence d'une impureté qu'ils ont négligée.

V. — ISOLEMENT DE LA MÉTAMYOSINE

La combinaison des propriétés de solubilité de la métamyosine, différentes de celles de l'actomyosine, et de ses propriétés d'extractibilité différentes de celles de la myosine et de la contractine, nous a permis son isolement du tissu musculaire fœtal et adulte à l'état de pureté électrophorétique.

La méthode de préparation définitivement adoptée pour cette protéine est décrite.

VI. — PROPRIÉTÉS DE LA MÉTAMYOSINE

1. Nous avons pu établir l'origine myofibrillaire de la métamyosine.
2. La métamyosine est extraite par des solutions salines de force ionique égale à 0,6 et de pH voisin de la neutralité, en présence ou en l'absence d'ATP, du muscle au repos ou contracturé.
3. Elle est soluble dans les solutions salines de force ionique supérieure à 0,3 et précipite par dilution aqueuse.
4. La métamyosine ne possède pas la propriété de se combiner à l'actine.
5. Elle n'a pas d'activité ATPasique.
6. Les préparations de métamyosine possèdent une activité acide adénylique désaminasique à des degrés différents suivant leur origine. Les préparations faites à partir de muscles fœtaux et de muscles de mouton adulte sont peu actives tandis que les préparations faites à partir de muscles de lapin adulte sont au contraire spécialement actives. (On obtient en moyenne une activité égale à 1/8^e de l'activité la plus grande obtenue jusqu'ici pour la désaminase cristallisée), ce qui pose le problème d'une relation physiologique entre les deux protéines au sein de la cellule musculaire.
7. Les préparations de métamyosine contiennent des acides nucléiques, ribo- et désoxyribonucléiques et plus particulièrement les préparations d'origine fœtale. Nous avons discuté la signification physiologique possible de ce fait.

VII. — HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA MÉTAMYOSINE

À l'électrophorèse, il y a lieu de distinguer deux constituants, de mobilité différente, dont les proportions relatives sont inversées chez le fœtus et l'adulte : le constituant le plus rapide prédomine dans les préparations d'origine adulte tandis que le plus lent au contraire prédomine dans les préparations d'origine fœtale. Nous avons tenté leur séparation par précipitation fractionnée dans les solutions d'acétate de sodium et réussi l'isolement du constituant rapide chez l'adulte et du constituant le plus lent chez le fœtus, à l'état de pureté électrophorétique.

Cette séparation nous a permis d'augmenter l'activité *acide adénylique désaminasique* qui se concentre sur le constituant rapide chez le lapin adulte et atteint jusqu'à un tiers de l'activité de l'enzyme cristallisé.

La *viscosité* des solutions fœtales est toujours plus élevée que celle des solutions d'origine adulte; nous avons discuté les différentes interprétations possibles de ce fait (présence d'impuretés visqueuses dans les solutions fœtales comme les acides nucléiques, états de polymérisation différents de mêmes protéines, ou protéines elles-mêmes différentes).

Notons la très grande viscosité observée pour le constituant lent d'origine fœtale isolé à l'état de pureté électrophorétique

$$\left[\frac{\eta_{sp}}{C_{g/ml}} \right]_{c \rightarrow 0} = 600$$

VIII. — COMPARAISON DE LA MÉTAMYOSINE AVEC LES AUTRES PROTÉINES MYOFIBRILLAIRES

La métamyosine est différente des autres protéines myofibrillaires connues.

Elle est certainement identique à l'impureté signalée par Mommaerts et Weber dans les préparations de myosine d'origine adulte.

CONCLUSION GÉNÉRALE.

En conclusion, nous avons individualisé une nouvelle protéine musculaire chez le lapin et le mouton. Elle se trouve dans la myofibrille. Ses propriétés électrophorétiques et de solubilité l'opposent aux autres protéines musculaires connues.

Présente en quantités très faibles dans le muscle adulte, elle est beaucoup plus abondante dans le muscle fœtal.

Une étude plus approfondie nous a permis de distinguer deux types de molécules à l'électrophorèse, chacun d'eux existant dans le muscle fœtal et adulte en proportions et avec des propriétés différentes, comme le montrent les résultats obtenus par viscosimétrie.

La présence, d'une part d'acides nucléiques spécialement abondants dans les préparations fœtales, et d'autre part de la désaminase de l'acide adénylique, spécialement abondante dans les préparations de lapins adultes, pose le problème des relations entre la métamyosine et ces constituants.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMBERSON (W. R.), WHITE (J. I.), BENSUAN (H. B.), HIMMELFARB (S.) et BLANKENHORN (B.). — *Am. J. Phys.*, 1957, *188*, 205.
2. BAILEY (K.). — *Biochem. J.*, 1948, *43*, 271.
3. BARCROFT (J.). — « *Researches on prenatal life* », 1948. Thomas Edit. Springfield, U.S.A.
4. BENSUAN (H. B.), WHITE (J. I.), HIMMELFARB (S.), BLANKENHORN (B. E.) et AMBERSON (W. R.). — *Am. J. Phys.*, 1957, *188*, 219.
5. BOURDILLON (J.). — *Arch. Biochem.*, 1948, *16*, 61.
6. BOWEN (W. J.). — *Am. J. Phys.*, 1951, *165*, 10.
7. CORSI (A.). — *Bioch. Biophys. Acta*, 1957, *25*, 640.
8. CORSI (A.), PERRY (S. V.). — *Biochem. J.*, 1958, *68*, 12.
9. CREPAX (P.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1952, *9*, 385.
10. CREPAX (P.), JACOB (J.) et CELDESLACHTS (J.). — *Bioch Biophys. Acta*, 1950, *4*, 410.
11. DERRIEN (Y.). — *Bioch. Biophys. Acta*, 1952, *8*, 631.
12. DUBUISSON (M.). — *Bull. Acad. Roy. Belg. (Sci.)*, 1947, *32*, 769.
13. DUBUISSON (M.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, *5*, 489.
14. DUBUISSON (M.). — *Nature*, 1950, *166*, 116.
15. ENGELHARDT (W. A.). — *Communications au 2^e Congrès Intern. Biochimie. Paris*, 1952, p. 50. — *Editions de l'Académie des Sciences de l'U.R.S.S., Moscou.*
16. ENGELHARDT (W. A.) et LJUBIMOVA (M. N.). — *Nature*, 1939, *144*, 668.
17. ERDOS (Th.) et SNELLMANN (O.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1948, *2*, 642.
18. FERDMANN (D. L.) et NETCHIPORENKO (Z. Y.). — *Ukr. Biokem. J.*, 1946, *18*, 105.
19. FEUER (G.), MOLNAR (F.), PETTKO (E.) et STRAUB (F. B.). — *Hung. Acta Physiol.*, 1948, *1*, 150.
20. FISKE (C. H.) et SUBARROW (Y.). — *J. Biol. Chem.*, 1925, *66*, 375.
21. GERGELEY (J.), GOUVEA (M. A.) et KARIBIAN (D.). — *J. Biol. Chem.*, 1955, *212*, 165.
22. HAMOIR (G.). — *Biochem. J.*, 1951, *48*, 146.
23. HAMOIR (G.). — *Discussion Faraday Soc.*, 1953, *13*, 116.
24. HAMOIR (G.). — *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 1955, *63*, Fasc. 4, (Supplément).
25. HANSON (J.) et HUXLEY (H. E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, *23*, 250.
26. HERMANN (H.) et NICHOLAS (S. S.). — *J. Exp. Zool.*, 1948, *107*, 165.
27. HUXLEY (H. E.) et HANSON (J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, *23*, 229.
- 27^{bis} JOLY (M.), SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J. C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, *59*, 165.
28. JOUBERT (D. M.). — *Nature*, 1955, *173*, 936.
29. KALCKAR (H. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, *167*, 429 et 461.
30. KASAVINA (B. S.). — *Questions de Chimie Médicale (U.R.S.S.)*, 1952, *4*, 189.
31. KASAVINA (B. S.) et KOUNIEVA (Z. I.). *Questions de Chimie Médicale (U.R.S.S.)*, 1953, *5*, 91.
32. KOVER (A.), KOVACS (T.) et KONIG (T.). — *Acta Physiol., Acad. Sci. Hung.*, 1957, *11*, 252.
33. KROEPELIN (H.). — *Kolloid Zeitschr.*, 1929, *47*, 294.
34. LOCKER (R. H.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, *20*, 514.
35. MIHALYI (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, *201*, 197.
36. MIHALYI (E.) et SZENT-GYORGYI (A. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, *201*, 189.
37. MIHALYI (E.) et SZENT-GYORGYI (A. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, *201*, 211.

38. MOMMAERTS (W. F.) et PARRISH (R. G.). -- J. Biol. Chem., 1951, 188, 545.
39. MORALES (M. F.) et BOTTIS (J.). -- Arch. Biochem. Biophys., 1952, 37, 283.
40. NANNINGA (L. B.). -- Arch. Biochem. Biophys., 1955, 56, 334.
41. NANNINGA (L. B.). -- Arch. Biochem. Biophys., 1955, 56, 349.
42. NEEDHAM (J.), SHEN (S. C.), NEEDHAM (D. M.) et LAWRENCE (A.S.C.). -- Nature, 1941, 147, 766.
43. NEKHOROCHEFF (J.), DONDON (J.) et GOURSSEF (Z.). -- C. R. Séances Acad. Sci., 1954, 238, 1450.
44. NIKIFORUK (G.), COLOWICK (S. P.). -- J. Biol. Chem., 1956, 219, 119.
45. OGUR (M.) et ROSEN (G.). -- Arch. Biochem., 1950, 25, 262.
46. PERRY (S. V.). -- Biochem. J., 1952, 51, 495.
47. PERRY (S. V.). -- Biochem. J., 1953, 55, 114.
48. PERRY (S. V.). -- Methods in Enzymology, Academic Press Inc., Edit., 1955, Vol. II, p. 582.
49. PERRY (S. V.), CORSI (A.). -- Biochem. J., 1958, 68, 5.
50. PORTZEHL (H.), SCHRAMM (G.) et WEBER (H. H.). -- Z. Naturforsch., 1950, 5 b, 61.
- 50^{bis} RAEBER (L.), SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J. C.). -- Comptes-rendus des séances de l'Acad. des Sc., 1955, 241, 1.000.
51. RAVIKOVITCH (Ch. M.), KASAVINA (B. S.). -- Rapport de l'Académie des Sciences de l'U.R.S.S., 1952, 82, 115.
52. ROBINSON (D. S.). -- Biochem. J., 1952, 52, 621.
53. SAMUELS (A.). -- Feder. Proceed., 1957, 46, N° 1, Part. 1, 396.
- 53^{bis} SCHAPIRA (G.), MARCAUD-RAEBER (L.), DREYFUS (J. C.). -- Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, 1.059.
54. SHENS-PEI-KEN et TSAO-TIEN-CHIN. -- Sci. Sinica, 1955, 4, 157.
55. SNELLMAN (O.). -- Biochim. Biophys. Acta, 1956, 21, 142.
56. SNELLMANN (O.) et TENOX (H.). -- Biochim. Biophys. Acta, 1954, 13, 199.
57. STRAUB (F. B.). -- Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged., 1942, 2, 3.
58. SVENSON (H.). -- Koll. Z., 1939, 87, 181.
59. SVENSON (H.). -- Koll. Z., 1940, 90, 141.
60. SVENSON (H.). -- Ark. Kemi. Miner. Geol., 1943, 17 A, N° 14.
61. SVENSON (H.). -- Acta Chem. Scand., 1951, 5, 1301.
62. SZENT-GYORGYI (A.). -- Chemistry of muscular contraction, Academic Press Inc., Edit., New-York, 1947, p. 29.
63. SZENT-GYORGYI (A.). -- Chemistry of muscular contraction, Academic Press Inc., Edit. New-York, 1951, p. 75.
64. SZENT-GYORGYI (A. G.). -- J. Biol. Chem., 1951, 192, 361.
65. SZENT-GYORGYI (A. G.). -- Arch. Biochem. Biophys., 1953, 42, 305.
66. SZENT-GYORGYI (A. G.), MAZIA (D.) et SZENT-GYORGYI (A.). -- Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 339.
67. SZENT-GYORGYI (A. G.) et BORBIRO (M.). -- Arch. Biochem. Biophys., 1956, 60, 180.
68. TSAO (T. S.). -- Biochim. Biophys. Acta, 1953, 11, 368.
69. TSAO (T. S.), BAILEY (K.) et ADAIR (G. S.). -- Biochem. J., 1951, 49, 27.
70. VARGA (E.), SZIGETI (J.) et KISS (E.). -- Acta Physiol. Hungarica, 1954, 5, 383.
71. VARGA (E.), KOVER (A.), KOVACS (T.), HETÉNYI (E.). -- Acta, Physiologica, Hungaricae, 1957, 11, 243.
72. VILLAFRANCA (G. W. de). -- J. Exp. Zool., 1954, 127, 367.
73. VILLAFRANCA (G. W. de). -- Arch. Biochem. Biophys., 1956, 61, 378.
74. WEBER (H. H.) et PORTZEHL (H.). -- Progr. Biophys. Biophys. Chem. 1954, 4, 60.
75. WIEDEMANN (E.). -- Helvetica Chimica Acta, 1952, 35, 82.
76. YA-PIN-LEE. -- J. Biol. Chem., 1957, 227, 987, 993 et 999.

TABLES DES MATIERES

CHAPITRE I

INTRODUCTION

	Pages
I. — <i>Revue des connaissances actuelles sur la composition protéinique de la myofibrille du muscle strié des mammifères adultes</i>	7
II. — <i>Revue des connaissances actuelles sur la composition protéinique de la myofibrille du muscle strié des fœtus de mammifères</i>	13
III. — <i>Objet du travail</i>	14

CHAPITRE II

DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISÉES

I. — <i>Techniques chimiques.</i>	
1. Préparations de la myosine	15
2. Dosage de l'azote	16
3. Dosage du phosphore	16
4. Dosage des acides nucléiques	16
5. Dosage de l'activité acide adénylique désaminasique	16
6. Dosage de l'activité ATPasique	16
II. — <i>Techniques physico-chimiques</i>	17
1. Electrophorèse	17
2. Viscosimétrie	18
3. Analyse des solutions de protéines par les courbes de solubilité	18

CHAPITRE III

OBSERVATION DE LA MÉTAMYOSINE

I. — <i>Premières observations faites chez le fœtus et l'adulte</i>	20
II. — <i>Evolution quantitative de la métamyosine au cours de la vie fœtale</i>	22

CHAPITRE IV

ISOLEMENT DE LA MÉTAMYOSINE

I. — <i>Principe</i>	25
1. La métamyosine est soluble à la force ionique de 0,3	25
2. La métamyosine est extractible en absence d'ATP	26
II. — <i>Description de la méthode de préparation de la métamyosine</i> ..	27
III. — <i>Rendement</i>	27
IV. — <i>Impuretés</i>	27
1. Myosine	27
2. Contractine	27
3. Trepomyosine	28
4. Acides nucléiques	28

CHAPITRE V

ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS DES PRÉPARATIONS DE MÉTAMYOSINE

	Pages
I. — <i>Etude physico-chimique</i>	29
A. Electrophorèse	29
B. Viscosimétrie	32
C. Etude de la solubilité de la métamyosine dans des solutions d'acétate de sodium	35
II. — <i>Etude chimique</i>	37
A. Acides nucléiques	37
B. Recherche de glucides	38
III. — <i>Etude enzymatique</i>	39
A. Activité A.T.Pasique	39
B. Activité acide adénylique désaminasique	39
IV. — <i>Etude topographique</i>	44
V. — <i>Fractionnement des préparations de métamyosine et étude des fractions</i>	44
VI. — <i>Discussion</i>	48

CHAPITRE VI

COMPARAISON DE LA MÉTAMYOSINE AVEC LES AUTRES PROTÉINES MYOFIBRILLAIRES	51
--	----

CONCLUSIONS

I. — <i>Etat de nos connaissances sur la composition protéinique myofibrillaire</i>	57
II. — <i>Techniques utilisées</i>	57
III. — <i>Observation de la métamyosine chez le fœtus et évolution au cours de la vie fœtale</i>	57
IV. — <i>Observation de la métamyosine chez l'adulte</i>	58
V. — <i>Isolement de la métamyosine</i>	58
VI. — <i>Propriétés de la métamyosine</i>	58
VII. — <i>Hétérogénéité de la métamyosine</i>	59
VIII. — <i>Comparaison de la métamyosine avec les autres protéines myofibrillaires</i>	59
CONCLUSION GÉNÉRALE	59
BIBLIOGRAPHIE	60

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Les protéines fœtales

Vu et approuvé :

Paris, le 19 mars 1958

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu

et Permis d'imprimer,

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH

Achevé d'imprimé le 6 Mai 1958.

Imprimerie E. LANORD - 22 bis, rue Chauvelot, Paris-15^e

